

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

EFFETS DIFFÉRENCIÉS ET CONFONDUS DE LA QUALITÉ DE L'EAU SUR
L'EFFICACITÉ DE LA DÉSINFECTION DES EAUX POTABLES

BENOIT BARBEAU
DÉPARTEMENT DES GÉNIES CIVIL, GÉOLOGIQUE ET DES MINES
ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

THÈSE PRÉSENTÉE EN VUE DE L'OBTENTION
DU DIPLÔME DE PHILOSOPHIAE DOCTOR
(GÉNIE CIVIL)
MARS 2004



National Library
of Canada

Bibliothèque nationale
du Canada

Acquisitions and
Bibliographic Services

Acquisitions et
services bibliographiques

395 Wellington Street
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

395, rue Wellington
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Your file Votre référence

ISBN: 0-612-92152-2

Our file Notre référence

ISBN: 0-612-92152-2

The author has granted a non-exclusive licence allowing the National Library of Canada to reproduce, loan, distribute or sell copies of this thesis in microform, paper or electronic formats.

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque nationale du Canada de reproduire, prêter, distribuer ou vendre des copies de cette thèse sous la forme de microfiche/film, de reproduction sur papier ou sur format électronique.

The author retains ownership of the copyright in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur qui protège cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms may have been removed from this dissertation.

Conformément à la loi canadienne sur la protection de la vie privée, quelques formulaires secondaires ont été enlevés de ce manuscrit.

While these forms may be included in the document page count, their removal does not represent any loss of content from the dissertation.

Bien que ces formulaires aient inclus dans la pagination, il n'y aura aucun contenu manquant.

Canada

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

ECOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

Cette thèse intitulée :

EFFETS DIFFÉRENCIÉS ET CONFONDUS DE LA QUALITÉ DE L'EAU SUR
L'EFFICACITÉ DE LA DÉSINFECTION DES EAUX POTABLES

présentée par : BARBEAU Benoit

en vue de l'obtention du diplôme de : Philosophiae Doctor

a été dûment acceptée par le jury d'examen constitué de :

Mme MILLETTE Louise, ing., Ph.D., présidente

Mme PRÉVOST Michèle, Ph.D., membre et directrice de recherche

M. DESJARDINS Raymond, ing., M.Ing., membre et codirecteur de recherche

M. RECKHOW David, ing., Ph.D., membre externe

M. PERRIER Michel, ing., Ph.D., membre

*On fait la science avec des faits, comme on fait une maison avec des pierres :
mais une accumulation de faits n'est pas plus une science
qu'un tas de pierres n'est une maison.*

Henri Poincaré

*Choisissez un travail que vous aimez et vous n'aurez
pas à travailler un seul jour de votre vie*

Confucius

J'ai décidé d'être heureux parce que c'est bon pour la santé.

Voltaire

*La durée est essentiellement une continuation
de ce qui n'est plus dans ce qui est.*

Henri Bergson

*Dire des idioties, de nos jours où tout le monde réfléchit profondément, c'est le
seul moyen de prouver qu'on a une pensée libre et indépendante.*

Boris Vian, écrivain, chanteur, acteur, pataphysicien et ingénieur

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier Mme Michèle Prévost sans qui cette thèse ne serait encore qu'un vague projet. Son légendaire pouvoir de persuasion (qui fut cette fois mis à rude épreuve) m'aura finalement convaincu des mérites du doctorat. Mme Prévost aura également permis d'initier le projet de collaboration entre l'École Polytechnique et les universités de *South Florida* et *Boulder* au Colorado, ce qui m'aura permis d'avoir accès à des collaborateurs exceptionnels ainsi que des moyens de réalisation à la hauteur de mes ambitions. Merci Michèle. Ta confiance et ton support font en sorte que j'ai atteint des objectifs de carrière dont la portée m'apparaissait encore hier inaccessible.

Merci également à Cédric pour sa compréhension (involontaire) de la situation. Cette thèse a surtout signifié moins de temps avec ton papa. J'espère que tu ne garderas pas de mauvais souvenirs des ordinateurs, pour m'avoir vu si souvent les utiliser. Puisse cette thèse être un exemple pour toi qu'il faut avant tout faire ce qu'on aime dans la vie. Merci également à Pierre et Fleurette, votre support inconditionnel et votre aide m'auront permis de me rendre jusqu'au bout. Puisse Cédric profiter un jour de parents à votre hauteur. (À défaut, il les aura toujours comme grands-parents !)

Je tiens également à remercier Mme Mélanie Rivard. La qualité de son travail analytique au laboratoire rejaillit sur la qualité des conclusions qui ont pu être tirées de ce travail. Ta rigueur et ton sens du travail bien fait sont tout à ton honneur. J'espère que tu gardes malgré tout de beaux souvenirs de tout ce temps dédié à sacrifier des microorganismes pour l'avancement de la Science... Je tiens également à souligner l'apport de Mme Géraldine El-Baz et M. Pascal Lesage dont j'ai eu le plaisir d'encadrer les travaux en stage et en projet de fin d'études, respectivement.

Merci à l'équipe de la Chaire : Annie, France, Marie-Claude, Jacinthe, Julie, Raymond et Yves. Nous avons réalisé beaucoup de beaux projets ensemble au cours

des années. Je souhaite que le meilleur reste à venir et que vous continuiez à trouver la passion de vous creuser la tête à mes côtés. Avec le bagage d'expérience dont notre groupe de recherche dispose, nous ne pouvons qu'attaquer des sujets de plus en plus difficiles et d'autant plus stimulants.

Je tiens également à remercier des collègues qui, sans toujours le savoir, m'auront appris beaucoup de choses, et pas nécessairement du domaine technique. Denis qui m'aura appris, en plus de mettre le *téflon* du bon bord, à connaître les restaurants *Mike's* aux quatre coins du Québec; Vincent, pour sa rigueur et son engagement total (et inégalé) dans l'encadrement des étudiants gradués ainsi que les vertus de son amitié; Patrick L., pour son scepticisme légendaire et sa méfiance génétique des douaniers; Boniface, pour son engagement et sa bonne humeur perpétuelle.

Je tiens à remercier M. Bernard Clément, lequel avait jeté des bases statistiques solides qui auront permis d'ériger cette thèse. J'avoue avoir proféré à quelques reprises certains mots durs à l'égard des plans fractionnaires (seulement lorsque mon fils était couché...). Quoiqu'il en soit, force m'est de constater que le travail accompli durant cette thèse est unique dans le domaine de la désinfection autant de par l'originalité de l'approche que par la robustesse des conclusions produites. Les commentaires des réviseurs des articles m'auront permis de constater que la robustesse n'est pas seulement une qualité appréciée au hockey.

Enfin, je tiens également à remercier les membres de mon jury, M. Michel Perrier, M. David Reckhow, Mme Michèle Prévost, M. Raymond Desjardins et M. Yves Comeau, d'avoir accepté de juger ce travail ainsi que pour leurs commentaires fort appréciés pour l'améliorer. Pour avoir déjà accompli une telle tâche, je sais combien la relecture d'un document dense est un travail notable. J'espère vous avoir rendu cette tâche agréable autant de par son contenu que de par sa forme.

RÉSUMÉ

Malgré l'abondance de travaux portant sur la désinfection, relativement peu de travaux de recherche se sont attardés à l'étude de la désinfection en utilisant des eaux naturelles. En effet, la vaste majorité des travaux complétés dans les années soixante-dix ont plutôt retenu comme approche d'utiliser des eaux reconstituées (en dopant de la turbidité organique et inorganique). Cette approche n'était pas mauvaise en soi puisqu'elle permettait aux chercheurs (i) des comparaisons directes avec leurs résultats antérieurs en eaux sans demande en oxydant et (ii) d'améliorer la reproductibilité des résultats. Il a fallu attendre les années quatre-vingt-dix pour que des chercheurs évaluent rigoureusement les effets de la désinfection en eaux naturelles (Haas et al., 1995, Oppenheimer et al., 1999). Dans les deux cas, il fut observé que la désinfection en eaux naturelles était moins efficace qu'en eaux ultra-pures tamponnées, sans pouvoir cependant mettre à jour le(s) paramètre(s) en jeu.

L'objectif général de ce projet de recherche a consisté à étudier la désinfection en eaux naturelles d'organismes résistants à la désinfection afin de mettre à jour les phénomènes à l'origine de la réduction de performance en eaux naturelles. Plus spécifiquement, ce projet visait à :

1. comparer l'effet du pH, de la température, de la matière organique et de la turbidité sur l'efficacité du chlore et du bioxyde de chlore ;
2. mettre à jour les interactions (synergies/antagonismes) existant entre ces différentes variables. Par exemple, l'effet du pH est-il fonction ou indépendant de la température ?
3. étudier les phénomènes d'agrégation microbiens et évaluer les caractéristiques des eaux favorisant leur apparition ;
4. comparer les résultats d'essais de désinfection réalisés en eaux synthétiques avec ceux réalisés dans des eaux naturelles de diverses origines.

5. confirmer la pertinence des facteurs de sécurité utilisés pour la conception des unités de désinfection de l'eau potable.

La première phase du projet a consisté à étudier l'impact de la turbidité, de la matière organique naturelle, de la température de l'eau et du pH sur l'inactivation des spores de *B. subtilis* et des coliphages MS2 par le chlore. Afin de réduire le nombre d'essais à réaliser et aussi d'accroître la robustesse des conclusions, un plan statistique fractionnaire a été utilisé, lequel comptait 8 conditions d'eau ($2^{4-1} = 8$) pour lesquelles trois essais d'inactivation (réplications) ont été effectués. La température et le pH se sont avérés les variables dominantes pour expliquer l'efficacité du chlore. Plus de 78% de la variabilité des doses requises pour inactiver 99% (2-log) de MS2 ou spores était causée par ces deux variables (pH 6.5 à 8.5, $T = 7$ à 22°C , DOC = 0 à 5 mg/L, 0 à 5 UTN). L'interaction entre le pH et la température était également significative, étant le 3^{ième} facteur d'importance (11%) après le pH et la température.

Par ailleurs, l'efficacité de l'acide hypochloreux s'est révélée être beaucoup moins influencée par la température que les ions hypochlorites. Un tel effet n'est actuellement pas pris en compte dans le domaine du traitement de l'eau potable. La présence de 5 mg C/L de matière organique naturelle en provenance de la rivière Suwannee (extrait par osmose inverse) était favorable à l'inactivation des spores, mais sans effet sur les virus MS2. Pour sa part, la turbidité inorganique (5 mg/L de kaolin) n'avait pas d'effet statistiquement significatif sur l'efficacité de la chloration.

La deuxième phase du projet a consisté à étudier l'impact de la turbidité, de la matière organique naturelle, de la température de l'eau et du pH sur l'inactivation des spores de *B. subtilis* et des coliphages MS2 par le bioxyde de chlore. Pour ce désinfectant, la présence d'agrégats causée par l'interaction du bioxyde, de la matrice de l'eau et des microorganismes, a forcé l'utilisation d'un modèle cinétique différent du traditionnel modèle de Chick-Watson. La présence d'agrégats de MS2 augmentait avec une baisse de pH de 8.5 à 6.5, alors que dans le cas des spores, la turbidité et la

température étaient les principaux facteurs en cause. La résistance des agrégats de spores et de MS2 était environ 20 fois plus grande que les organismes seuls.

La présence de matière organique naturelle améliorait significativement ($p < 0.01$) l'efficacité du bioxyde de chlore. Par exemple, les doses requises pour inactiver 90% (1-log) des spores de *B. subtilis* étaient réduites de 819 à 326 mg•min/L en présence de 5 mg C/L. Pour leur part, les doses requises pour inactiver 99,99% (4 log) des coliphages MS2 étaient réduites de 0,79 à 0,57 mg•min/L en présence de 2 mg C/L. La turbidité (5 UTN) a eu un impact négligeable sur l'inactivation des coliphages MS2, mais a fait accroître de 386 à 600 mg•min/L la dose requise pour 90% (1 log) d'inactivation de spores.

La troisième phase du projet a consisté en une validation des effets observés en eaux synthétiques sur des eaux naturelles en provenance de trois installations en Amérique du Nord (Atlanta, GA; Grand Rapids, MI; Montréal, PQ et une installation dans les Caraïbes, San Juan, PR). Ces essais ont été réalisés sur des eaux brutes dopées en spores et ayant subi divers protocoles (filtration, ajout de tampon, etc.).

Ces essais ont permis de soutenir les conclusions quant à l'impact marginal de la turbidité sur l'inactivation des spores de *B. subtilis*. Filtrer des eaux brutes dont la turbidité était de 1.0 à 2.7 UTN à l'aide d'une membrane de 0.45 μm n'a pas permis d'améliorer significativement l'efficacité du chlore ou du bioxyde de chlore (pour une dose effective équivalente de désinfectant).

L'effet favorable de la matière organique naturelle (MON) sur l'efficacité du bioxyde de chlore a également été re-constaté pour trois des quatre eaux étudiées. Des matières organiques naturelles différentes de celle de la rivière Suwannee (utilisée pour les eaux reconstituées) produisent donc également une amélioration de la désinfection. L'eau de Puerto-Rico s'est cependant comportée différemment puisque aucun effet favorable de la MON n'y fut observé. Il est donc possible que cet effet soit spécifique

au type de matière organique présent ou fût inhibé par certaines autres caractéristiques de l'eau. À cet égard, l'eau de Puerto-Rico se distinguait essentiellement des trois autres eaux par la présence de manganèse dissous (0.1 - 0.2 mg/L).

L'idée directrice ayant mené à l'élaboration de ce projet était de confirmer l'impact des eaux naturelles sur l'efficacité de la désinfection afin d'estimer si les facteurs de sécurité utilisés lors de la conception des procédés de désinfection des eaux potables sont appropriés. Actuellement, ces facteurs sont de trois ordres : (i) facteurs de sécurité directement incorporés dans les tables de CT, (ii) facteur de sécurité touchant le choix de la concentration pour le calcul du CT (Concentration résiduelle) et (iii) facteur de sécurité touchant le choix du temps de contact (CT_{10}). Les facteurs de sécurité inclus dans les tables de CT sont de l'ordre de 1.0 à 3.0, selon la combinaison désinfectant-organisme considérée. Les facteurs de sécurité concernant les choix de la concentration effective et du temps de contact effectif peuvent être contournés par l'utilisation de modélisation, telle que l'*Integrated Disinfection Design Framework*. En effet, ce type de modèle permet de calculer précisément le CT_{effectif} d'un procédé de désinfection. Cependant, considérant les inconnues liées à l'établissement des tables de CT (effet de la présence d'agrégats, variation de résistance à l'intérieur d'une même espèce), il apparaît judicieux de conserver un facteur de sécurité sur la dose fournie par le calcul du CT_{effectif} (laquelle est typiquement de 1.5 à 6 fois plus élevée que le CT_{10}). Ce facteur de sécurité devrait tenir compte du nombre de barrières disponibles dans une filière de traitement donnée. Pour les installations de traitement exclues de la filtration de leurs eaux de surface, l'utilisation du CT_{10} (plutôt que le CT_{effectif}) est recommandée afin de conserver un facteur de sécurité accru vis-à-vis la présence d'agrégats microbiens dans les eaux à désinfecter.

À la lumière des résultats obtenus durant cette thèse, il est recommandé de poursuivre les recherches en ce qui concerne l'effet favorable de la matière organique. Il serait nécessaire de confirmer ce résultat à l'aide de matières organiques de diverses

origines. Il apparaît également souhaitable d'approfondir nos connaissances au sujet des phénomènes dit de *tailing*, c'est-à-dire la portion de la courbe d'inactivation pour laquelle le taux d'inactivation diminue en fonction du CT. La très vaste majorité des travaux antérieurs dans le domaine de la désinfection se sont seulement intéressés à la phase linéaire d'inactivation et à la phase initiale de latence. Or, l'atteinte de niveaux d'inactivation élevés (> 4 log, par exemple) est souvent contrôlée par ce phénomène. À notre avis, une telle recherche équivaut à étudier plus en détails les causes de formation d'agrégats lors de la désinfection des eaux naturelles, en considérant non seulement les effets des caractéristiques de l'eau mais également de l'influence des oxydants.

ABSTRACT

Despite the abundance of research related to drinking water disinfection published over the years, few studies focused their attention on the evaluation of the impacts of disinfection in natural waters. In the 1970s, most researchers worked with synthetic waters using clays or cell debris as a surrogate for turbidity. This approach offered the advantages of (i) allowing for direct comparisons with disinfection assays in oxidant demand-free systems and (ii) improve the reproducibility of their conclusions. The impacts of natural water characteristics on disinfection efficacy was rigorously evaluated in the 1990s (Haas et al., 1995, Oppenheimer et al., 1999). In both studies, it was concluded that inactivation in natural waters was less efficient than in ultra-pure buffered waters, although the exact mechanisms at play were never identified.

The general objective of this thesis was to study inactivation of resistant organisms in natural waters in order to identify the origins of the observed lower inactivation in natural waters. More specifically, this project aimed at:

1. Comparing the effect of pH, temperature, natural organic matter and turbidity on the efficacy of free chlorine and chlorine dioxide,
2. Evaluate the interactions (synergies – antagonisms) existing among water quality variables. For example, is the pH effect influence by water temperature?
3. Study the conditions promoting microbial aggregation and evaluate the increase in resistance gained through this mechanism,
4. Compare inactivation data in synthetic waters and natural waters of various characteristics,
5. Confirm the adequacy of current safety factors employed during the design of disinfection processes,

The initial phase of this project consisted in studying the role of turbidity, NOM, pH and temperature on the efficacy of free chlorine toward *B. subtilis* spores and MS2 coliphages. In order to reduce the number of assays to realise and increase the robustness of our demonstration, a partial half-factorial statistical design was used, which include eight water types (pH 6.5 - 8.5, T = 7 - 22°C, DOC = 0 - 5 mg/L, 0 - 5 NTU) for which three replicates were done. Temperature and pH were the most dominant variables, accounting for more than 78% of the variance of the doses requires to inactivate 99% (2-log) of MS2 coliphages or spores. The interaction of pH and temperature was statistically significant, being the 3rd most important factor to predict the variations in chlorine efficacy.

Hypochlorous acid was found to be much less sensitive than hypochlorites to a decrease in water temperature. Such effect is currently not taken into account by the regulations using the CT concept. The addition of 5 mg C/L (Suwannee river NOM-extract) to synthetic waters was favourable to the inactivation of *B. subtilis* spores, but not to coliphages MS2. On the other hand, inorganic turbidity (5 mg/L of kaolin clay) did not significantly impact free chlorine efficacy.

The second phase of this project consisted in studying the role of turbidity, NOM, pH and temperature on the efficacy of chlorine dioxide toward *B. subtilis* spores and MS2 coliphages. For this oxidant, a different modelling strategy had to be employed due to the presence of microbial aggregates, which caused a deviation from the traditional Chick-Watson kinetic (tailing). The occurrence of MS2 aggregates increased following a decrease of pH from 8.5 to 6.5. In the case of spores, turbidity and temperature were the two most dominant variables to explain the occurrence of tailing. The resistance of microbial aggregates to chlorine or chlorine dioxide inactivation was twenty times higher than for single organisms.

The presence of NOM improved significantly ($p < 0.01$) the efficacy of chlorine dioxide. For example, the CT 1-log doses required to inactivate *B. subtilis* spores were

reduced from 819 to 326 mg•min/L when 5 mg C/L was added to synthetic waters. The doses required to inactivate 99,99% (4 log) of MS2 coliphages were lowered from 0.79 to 0.57 mg•min/L in the presence of 2 mg C/L. The role of turbidity was once again negligible on the inactivation of MS2 coliphages, but did raise the CT-1 log of *B. subtilis* spores from 386 to 600 mg•min/L.

The third part of this project validated the observed effects in synthetic waters using natural waters originating from three water treatment plants (WTP) in North America and one WTP located in the Caribbean (Atlanta, GA; Grand Rapids, MI; Montreal, PQ and San Juan, PR). These assays were conducted on raw waters spiked with *B. subtilis* spores and having undergone various treatment protocols (filtration, buffering, etc.).

These assays in natural waters supported our conclusions regarding the marginal role of turbidity on disinfection efficacy. Filtering raw water having turbidities of 1.0 to 2.7 NTU using a 0.45 µm membrane did not improve significantly inactivation as long as equivalent effective doses ($CT_{\text{effective}}$) were targeted.

The favourable effect of NOM on chlorine dioxide efficacy was once again observed for three out of the four waters under evaluation. Other NOM than the one originating from Suwannee River caused an equivalent improvement in inactivation. The waters from Puerto-Rico did however differed as no significant improvement was observed. It is therefore possible that this effect is NOM-specific or that it was inhibited in Puerto-Rico waters due to some unknown water characteristics. The most striking difference of Puerto-Rico waters was the presence of dissolved manganese (0.1 - 0.2 mg/L).

The governing idea behind this project was to confirm the adequacy of the safety factors currently used during the design of disinfection processes. These safety factors include: (i) a safety factor included directly in the CT tables provided by the USEPA, (ii) a safety factor related to the choice of the residual concentration for the CT calculation and (iii) a safety factor related to the calculation of the effective hydraulic residence time (T_{10}). The safety factors included in the CT tables vary from 1.0 to 3.0,

depending on the organism targeted and the disinfectant employed. The safety factors related to the calculations of the effective concentration and hydraulic residence time can be avoided by the use of the Integrated Disinfection Design Framework (Bellamy et al., 1998). This modelling approach enables a precise evaluation of the effective CT delivered in a unit disinfection process. However, considering the numerous unknowns with respect to the publication of the USEPA CT tables (impact of aggregates, intra-species variations in resistance to disinfection), it appears reasonable to preserve a safety factor on the $CT_{\text{effective}}$ calculation (which is typically 1.5 to 6 times higher than the CT_{10} value). The choice of the safety factor should depend on the overall robustness of the WTP, which is related to the number of available consecutive unit processes and the fluctuations of raw microbiological water quality. For WTPs granted with a filtration waiver, the use of the CT_{10} (instead of the $CT_{\text{effective}}$) is recommended due to the necessity to account for the potential occurrence of microbial aggregates in the waters to be disinfected.

In the light of the results obtained during this work, it is advisable to pursue the investigations regarding the beneficial role of natural organic matter on disinfection. This phenomenon should be confirmed using natural waters from various origins and various microorganisms. It is also recommended to deepen our understanding of the occurrence of tailing in inactivation curves. Most past scientific literature have devoted their interest to the linear portion of the inactivation curves. However, the objective of attaining high levels of inactivation (> 4 log, for example) is often controlled by the occurrence of tailing, especially in natural waters. In our opinion, such investigation is equivalent to study in more details the causes of aggregate formation, taking into account not only the effect of water quality, but also the influence of the oxidants added for the purpose of disinfection.

TABLE DES MATIÈRES

DÉDICACE	IV
REMERCIEMENTS	V
RÉSUMÉ	VII
ABSTRACT	XII
TABLE DES MATIÈRES	XVI
LISTE DES TABLEAUX.....	XXI
LISTE DES FIGURES	XXIII
LISTE DES ANNEXES	XXIX
LISTE DES SIGLES ET ABBRÉVIATIONS.....	XXX
 CHAPITRE 1 INTRODUCTION	 1
1.1 Mise en contexte.....	1
1.2 Organisation de la thèse	5
 CHAPITRE 2 REVUE DE LITTÉRATURE.....	 6
2.1 Le chlore: la référence dans le domaine de la désinfection.....	6
2.1.1 Généralités.....	6
2.1.2 Mécanismes d'inactivation.....	6
2.1.3 Caractéristiques de l'eau influençant l'efficacité de la chloration	8
2.1.3.1 Facteurs influençant l'activité chimique du chlore	9

2.1.3.2	Facteurs influençant la persistance du chlore en solution.....	16
2.1.3.3	Facteurs influençant l'accessibilité du chlore au microorganisme visé	18
2.2	Le bioxyde de chlore: une alternative à la chloration	22
2.2.1	Généralités.....	22
2.2.2	Mécanismes d'inactivation.....	22
2.2.3	Caractéristiques de l'eau influençant l'efficacité du bioxyde de chlore.....	24
2.2.3.1	Facteurs influençant l'activité chimique du ClO_2	24
2.2.3.2	Facteurs influençant la persistance du bioxyde de chlore en solution.....	27
2.2.3.3	Facteurs influençant l'accessibilité du chlore au microorganisme visé	29
2.3	Modélisation de l'inactivation des micro-organismes.....	31
2.3.1	Modèles pour des eaux sans décroissance du désinfectant	31
2.3.2	Modèles avec décroissance du désinfectant	35

CHAPITRE 3 OBJECTIFS DE RECHERCHE ET DÉMARCHÉ

	EXPÉRIMENTALE	40
3.1	Critiques des travaux antérieurs dans le domaine	40
3.2	Objectifs	41
3.3	Mise en œuvre	43
3.3.1	Essais en eaux reconstituées.....	44
3.3.1.1	Désinfectants à l'étude	44
3.3.1.2	Microorganismes.....	44
3.3.1.3	Montage expérimental.....	46
3.3.1.4	Plan expérimental.....	46
3.3.1.5	Caractéristiques des eaux étudiées.....	49
3.3.1.6	Préparation et analyse des désinfectants	50

3.3.2	Modélisation des essais d'inactivation.....	50
3.4	Essais en eaux naturelles.....	52
3.4.1	Caractérisation initiale des eaux étudiées.....	52
3.4.2	Description du plan expérimental.....	53

CHAPITRE 4 IMPACTS OF WATER QUALITY ON FREE CHLORINE		
	EFFICACY IN SYNTHETIC WATERS	58
4.1	Introduction	60
4.2	Objectives.....	62
4.3	Materials and Methods	62
4.3.1	Experimental Design	62
4.3.2	Synthetic Water Preparation.....	64
4.3.3	Microorganisms Culturing and Analysis.....	65
4.3.4	Oxidant Preparation and Analysis.....	67
4.4	Results.....	68
4.4.1	Water Quality Variables Investigated	68
4.4.2	Modeling Inactivation Kinetics	69
4.4.3	Analysis of Variance (ANOVA)	71
4.4.4	Impacts of water quality on the aggregation of microorganisms	74
4.4.5	Data Analysis Using Statistical Models	75
4.4.5.1	Impact of pH and Temperature on Chlorine Efficacy.....	77
4.4.5.2	Impact of Turbidity on Chlorine Efficacy.....	79
4.4.5.3	Impact of Natural Organic Matter on Chlorine Efficacy	80
4.5	Discussion	82
4.6	Conclusions	86
4.7	References	88

CHAPITRE 5 IMPACTS OF WATER QUALITY ON CHLORINE DIOXIDE EFFICACY IN SYNTHETIC WATERS.....93

5.1	Introduction	94
5.2	Materials and Methods	95
5.2.1	Experimental Design	95
5.2.2	Synthetic Water Preparation.....	97
5.2.3	Microorganisms Culturing and Analysis.....	98
5.2.4	Oxidant Preparation and Analysis	99
5.3	Results	100
5.3.1	Modeling Inactivation Kinetics	100
5.3.2	Effect of Water Quality on the Inactivation Kinetics Parameters	104
5.3.3	Analysis of Variance (ANOVA)	104
5.3.4	Evaluation of Quantitative Impacts of Water Quality on Disinfection Kinetics.....	107
5.4	Discussion	112
5.5	Conclusions	117
5.6	References	119

CHAPITRE 6 IMPACTS OF WATER QUALITY ON CHLORINE AND CHLORINE DIOXIDE EFFICACY IN NATURAL WATERS ..123

6.1	Introduction	124
6.2	Objectives.....	126
6.3	Material and Methods.....	126
6.3.1	Source Waters under Investigation.....	126
6.3.2	Microorganisms	127
6.3.3	Experimental Design	128
6.3.4	Description of the Experimental Disinfection Procedure.....	129
6.3.5	Microorganism Culture and Enumeration	129

6.3.6	Oxidant Analysis	130
6.3.7	Inactivation Kinetic Modeling and Statistical Analysis	130
6.4	Results	131
6.4.1	Water Matrix Effects (CND #1 vs CND #2)	131
6.4.2	Impact of pH/buffering (CND #2 vs CND #3)	132
6.4.3	Impact of Turbidity (CND #2 vs CND #4)	135
6.4.4	Comparison of Indigenous and <i>B. subtilis</i> Spore Inactivation	137
6.5	Discussion	138
6.6	Conclusions	142
6.7	References	143
CHAPITRE 7	DISCUSSION GÉNÉRALE ET SYNTHÈSE.....	148
7.1	Originalité de l'approche expérimentale retenue	148
7.1.1	Méthodologie statistique : Utilisation des plans fractionnaires.....	148
7.1.2	Modélisation cinétique : Utilisation du concept de CT_{effectif}	150
7.2	Efficacité relative des désinfectants	152
7.3	Influence de la qualité de l'eau	154
7.4	Mécanismes d'inactivation.....	161
7.5	Transposition des résultats aux eaux naturelles	164
7.6	Retombées pratiques pour l'industrie.....	165
CHAPITRE 8	CONCLUSIONS ET RECOMMANDATIONS.....	170
RÉFÉRENCES	173
ANNEXES	173

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 2-1: Efficacité relative de l'acide hypochloreux par rapport aux ions hypochlorites.	12
Tableau 2-2: Comparaison de l'effet de la température (Q_{10}) sur l'efficacité de la chloration pour différents microorganismes.....	15
Tableau 2-3: Comparaison de l'effet de la température sur l'efficacité du bioxyde de chlore pour différents microorganismes	27
Tableau 2-4: Synthèse des modèles de désinfection répertoriés dans la littérature	39
Tableau 3-1 : Description du plan expérimental retenu pour la phase I du projet.....	48
Tableau 3-2: Description du plan statistique (identique pour les 4 combinaisons du tableau 3-1).....	48
Tableau 3-3: Caractéristiques des eaux naturelles utilisées	53
Tableau 3-4: Plan d'essai en eaux naturelles (répété pour les 4 eaux naturelles et les 2 désinfectants)	55
Tableau 3-5: Conditions d'essai de désinfection et caractéristiques des eaux mesurées sur les réacteurs d'Essai des eaux de Montréal et San-Juan.....	56
Tableau 3-6: Conditions d'essai de désinfection et caractéristiques des eaux mesurées sur les réacteurs d'essai des eaux de Grand Rapids (Michigan) et Clayton County.....	57
Tableau 4-1: Description of each disinfection assay condition resulting from the statistical design.	64
Tableau 4-2: Description of disinfection assay conditions (actual measured values).	68
Tableau 4-3: Inactivation kinetic parameters derived using the effective Chick-Watson model for <i>Bacillus subtilis</i> spores and MS2 coliphages.....	70

Tableau 4-4	Standardized effects of selected control variables (water quality) on the output variables (Ct-lag phase, Ct-2 Log values) for <i>Bacillus subtilis</i> spores and MS2 phages.....	72
Tableau 4-5:	Sensitivity analysis: Percentages of explanation of the selected control variables (water quality) on the output variables (Ct-lag phase, Ct-2 Log values) for <i>Bacillus subtilis</i> spores and MS2 phages.....	73
Tableau 4-6 :	Statistical equations predicting the required Ct value for 2 Log inactivation of MS2 phages and <i>Bacillus subtilis</i> spores under various water quality conditions.....	76
Tableau 5-1:	Description of each disinfection assay condition resulting from the statistical design.....	97
Tableau 5-2:	Inactivation kinetic parameters derived using the parallel Chick-Watson model for <i>Bacillus subtilis</i> spores and MS2 coliphages inactivation by chlorine dioxide.....	103
Tableau 5-3:	Sensitivity analysis: Percentages of explanation of the control variables (water quality) on various dependent variables (K_S , K_A , $\log r$, Ct-1 Log values) for <i>Bacillus subtilis</i> spores.	105
Tableau 5-4:	Sensitivity analysis: Percentages of explanation of the selected control variables (water quality) on various dependent variables (K_S , K_A , $\log(r)$, Ct-4 Log values) for MS2 phages.	106
Tableau 6-1:	Participating Utilities and Water Qualities for Disinfection Assays with Natural Waters.....	127
Tableau 6- 2:	Experimental Matrix for the Study of Water Quality Impacts	128

LISTE DES FIGURES

Figure 2-1: Illustration conceptuelle des trois phénomènes à la base de l'influence des caractéristiques de l'eau sur l'efficacité de la désinfection d'un virus de Norwalk. Source de l'image: Wadsworth Center of the New York State Department of Health.	8
Figure 2-2: Distribution relative de l'acide hypochloreux selon la température et le pH de l'eau. Adapté de Morris (1966).....	11
Figure 4-1: Inactivation of (a) MS2 coliphages and (b) <i>Bacillus subtilis</i> spores with free chlorine. Condition #1: pH 6.5, temperature 7°C, turbidity 0 NTU and DOC 0 mg C/L. Numbers in inset refer to the average chlorine residual concentration in mg/L in the reactors.	71
Figure 4-2: Predicted versus Observed Ct values for 2 Log inactivation of MS2 phages ($r^2=0.98$) and <i>Bacillus subtilis</i> spores ($r^2 = 0.99$) based on the statistical model.	77
Figure 4-3: Impact of pH and temperature on the inactivation of <i>Bacillus subtilis</i> spores (left) and MS2 phages (right) by free chlorine. The error bars represent the 95 th confidence interval. Turbidity < 0.05 NTU, DOC < 0.2 mg C/L.	78
Figure 4-4: Impact of inorganic turbidity on the inactivation of <i>Bacillus subtilis</i> spores (left) and MS2 phages (right) by free chlorine for various water temperatures (pH = 8.5, DOC = 0 mg/L). The error bars represent the 95 th confidence interval on the predicted model CT-2 log (cf. Table 4-6).....	79
Figure 4-5: Impact of NOM (quantified as DOC) on the inactivation of <i>Bacillus subtilis</i> spores (left) and MS2 phages (right) at various temperatures. Error bars represent the 95 th confidence interval.....	81

Figure 4-6: Assays to confirm the impact of DOC on <i>Bacillus subtilis</i> spores inactivation using free chlorine at 7°C (left) and 22°C (right) Note: A1 and A2 (etc.) denote duplicate reactors. Turbidity < 0.05 NTU. Average chlorine dosages during the assays are provided in the legend.	86
Figure 5-1: Inactivation of (a) <i>Bacillus subtilis</i> spores and (b) MS2 coliphages with chlorine dioxide. Condition #3 exhibiting minor tailing: pH 6.5, temperature 22°C, turbidity 0 NTU and DOC 5 mg C/L (spores) or 2 mg C/L (MS2). Numbers in inset refer to the average ClO ₂ residual concentration in mg/L in each replicate test reactors. Line of best fit is the inactivation kinetic provided in Table 5-2 with the usual 95 th confidence bands.....	100
Figure 5-2: Inactivation of (a) <i>Bacillus subtilis</i> spores and (b) MS2 coliphages with chlorine dioxide. Condition #4 exhibiting severe tailing: pH 6.5, temperature 22°C, turbidity 0 NTU and DOC 5 mg C/L (spores) or 2 mg C/L (MS2). Numbers in inset refer to the average ClO ₂ residual concentration in mg/L in each replicate test reactors. Line of best fit is the inactivation kinetic provided in Table 2 with the usual 95 th confidence bands.....	101
Figure 5-3: Influence of pH (a), temperature (b), DOC (c) and turbidity (d) on the model parameter r describing the fraction of aggregated organisms. Error bars represent the 95 th confidence interval.....	108
Figure 5-4: Influence of pH on <i>B. subtilis</i> spores (a) and MS2 phages inactivation of single organisms (K_S) and aggregated organisms (K_A). Error bars represent the 95 th confidence interval.....	109
Figure 5-5: Influence of temperature on <i>B. subtilis</i> spores (a) and MS2 phages inactivation of single organisms (K_S) and aggregated organisms (K_A). Error bars represent the 95 th confidence interval.	110

Figure 5-6: Influence of dissolved organic carbon concentrations on <i>B. subtilis</i> spores (a) and MS2 phages inactivation of single organisms (K_S) and aggregated organisms (K_A). Error bars represent the 95 th confidence interval.	111
Figure 5-7: Influence of turbidity (induced using kaolin) on <i>B. subtilis</i> spores (a) and MS2 phages inactivation of single organisms (K_S) and aggregated organisms (K_A). Error bars represent the 95 th confidence interval.....	112
Figure 6-1: Free Chlorine (a) and Chlorine Dioxide (b) Inactivation of <i>B. subtilis</i> Spores Spiked in Various Buffered (pH 6.5) Surface Waters. Confidence bands are the 95 th centile confidence intervals.	131
Figure 6-2: Free Chlorine Inactivation of <i>B. subtilis</i> Spores Spiked in Unbuffered (ambient pH) Surface Waters or Buffered (pH 6.5) Ultra-pure Water. Bold line represents the inactivation kinetic calculated in ultra-pure buffered water.....	134
Figure 6-3: Chlorine Dioxide Inactivation of <i>B. subtilis</i> Spores Spiked in Unbuffered Surface Waters. (a) Montreal and Michigan waters, (b) Puerto-Rico and Clayton County waters. Bold and dashed lines represent the average inactivation kinetic and 95% prediction intervals respectively, calculated in buffered waters at pH=6.5 (N=5). Bold and clear symbols represent replicate reactors.	135
Figure 6-4: Free Chlorine (a) and Chlorine Dioxide (b) Inactivation of <i>B. subtilis</i> Spores Spiked in Filtered Surface Waters. Bold line represents (a) the inactivation kinetic in ultra-pure waters or (b) the calculated (N=5) inactivation kinetic in unfiltered waters buffered at pH=6.5.....	136
Figure 6-5: Free Chlorine (a) and Chlorine Dioxide (b) Inactivation of Indigenous Spores in Surface Waters. Bold lines w/o symbols indicate <i>B. subtilis</i> inactivation kinetic in natural water as a means of comparison.	137

Figure 7-1: Comparaison des doses requises pour inactiver 99% (CT – 2log) de divers organismes à l’aide du chlore et du bioxyde de chlore. Les variations de doses observées correspondent aux variations causées par la qualité de l’eau (pH, turbidité, température, COD). Source des données O ₃ et NH ₂ Cl : Mysore et al., 2003.....	153
Figure 7 2: Comparaison des effets standardisés de la qualité de l’eau sur la dose requise (CT 2log) pour inactiver les spores de <i>Bacillus subtilis</i> ou les virus MS2 avec divers désinfectants. Les effets ne dépassant pas 2.1, <i>i.e.</i> la zone grisée, ne sont pas significatifs à p=0.05. Source des données O ₃ /NH ₂ Cl : Mysore et al., 2003.....	156
Figure 7-3: Morphologie (a) d’une spore de <i>B. subtilis</i> – adapté de Korch et Doi (1971) et (b) d’un virion de coliphage MS2. Source : wwwchem.leidenuniv.nl/genexpress/nn/ N: nucléoplaste, c: cortex, ISC et OSC: <i>inner and outer spore coat</i>	161
Figure 7-4: Identification à l’aide des énergies d’activation des mécanismes (diffusion vs réaction enzymatique) limitant les mécanismes d’inactivation du bioxyde de chlore et du chlore	163
Figure A-1: Inactivation des spores de <i>B. subtilis</i> par le chlore pour différents types d’eau. Voir Tableau 3-2 pour la description des eaux.	194
Figure A-2: Inactivation des spores de <i>B. subtilis</i> par le chlore pour différents types d’eau. Voir Tableau 3-2 pour la description des eaux.	195
Figure A-3: Courbes de décroissance du chlore libre durant les essais (Cnd 1 à 6)	196
Figure A-4: Courbes de décroissance du chlore libre durant les essais (Conditions 7 à 9).....	197
Figure B-1: Inactivation des spores de <i>B. subtilis</i> par le bioxyde de chlore pour différents types d’eau. Voir Tableau 3-2 pour la description des eaux.	199

Figure B-2: Inactivation des spores de <i>B. subtilis</i> par le bioxyde de chlore pour différents types d'eau. Voir Tableau 3-2 pour la description des eaux.	200
Figure B-3: Courbes de décroissance du chlore libre durant les essais (Conditions 1 à 6).....	201
Figure B-4: Courbes de décroissance du chlore libre durant les essais (Conditions 7 à 9).....	202
Figure C-1: Inactivation des coliphages par le chlore pour différents types d'eau. Voir Tableau 3-2 pour la description des eaux.....	204
Figure C-2: Inactivation des coliphages par le chlore pour différents types d'eau. Voir Tableau 3-2 pour la description des eaux.....	205
Figure C-3: Courbes de décroissance du bioxyde de chlore durant les essais (Conditions 1 à 6).....	206
Figure C-4: Courbes de décroissance du bioxyde de chlore durant les essais (Conditions 7 à 9).....	207
Figure D-1: Inactivation des coliphages MS2 par le bioxyde de chlore pour différents types d'eau. Voir Tableau 3-2 pour la description des eaux.	209
Figure D-2: Inactivation des coliphages MS2 par le bioxyde de chlore pour différents types d'eau. Voir Tableau 3-2 pour la description des eaux.	210
Figure D-3: Courbes de décroissance du bioxyde de chlore durant les essais (Conditions 1 à 6).....	211
Figure D-4: Courbes de décroissance du bioxyde de chlore durant les essais (Conditions 7 à 9).....	212

Figure E-1: Décroissance du chlore libre durant les essais d'inactivation dans les eaux de la Ville de Montréal. Voir tableau 3-5 pour une description des conditions des essais.	214
Figure E-2: Décroissance du bioxyde de chlore durant les essais d'inactivation dans les eaux de la Ville de Montréal. Voir tableau 3-5 pour une description des conditions des essais.....	215
Figure E-3: Décroissance du chlore libre durant les essais d'inactivation dans les eaux de San Juan, Puerto-Rico. Voir tableau 3-6 pour une description des conditions des essais.....	216
Figure E-4: Décroissance du bioxyde de chlore durant les essais d'inactivation dans les eaux de San Juan, Puerto-Rico. Voir tableau 3-6 pour une description des conditions des essais.....	217
Figure E-5: Décroissance du chlore libre durant les essais d'inactivation dans les eaux de Gwinnett County, Georgia. Voir tableau 3-6 pour une description des conditions des essais.....	218
Figure E-6: Décroissance du bioxyde de chlore durant les essais d'inactivation dans les eaux de Gwinnett County, Georgia. Voir tableau 3-6 pour une description des conditions des essais.....	219
Figure E-7: Décroissance du chlore libre durant les essais d'inactivation dans les eaux de Grand Rapids, Michigan. Voir tableau 3-5 pour une description des conditions des essais.....	220
Figure E-8: Décroissance du chlore libre durant les essais d'inactivation dans les eaux de Grand Rapids, Michigan. Voir tableau 3-5 pour une description des conditions des essais.....	221

LISTE DES ANNEXES

ANNEXE A	Courbes d'inactivation des spores de <i>B. subtilis</i> par la chloration en eaux synthétiques.....	193
ANNEXE B	Courbes d'inactivation des spores de <i>B. subtilis</i> par le bioxyde de chlore en eaux synthétiques.....	198
ANNEXE C	Courbes d'inactivation des coliphages MS2 par la chloration en eaux synthétiques.....	203
ANNEXE D	Courbes d'inactivation des coliphages MS2 par le bioxyde de chlore en eaux synthétiques.....	208
ANNEXE E	Décroissance du chlore libre et du bioxyde de chlore durant les essais d'inactivation en eaux naturelles.....	213

LISTE DES SIGLES ET ABBRÉVIATIONS

ADN	Acide désoxyribonucléique
ARN	Acide ribonucléique
ATCC	American Type Culture Collection
°C	Degré Celcius
C	Concentration résiduelle de désinfectant mesurée au temps t
C ₀	Concentration initiale de désinfectant une fois la demande immédiate exercée
CFU	Colony-Forming Unit
COD	Carbone organique dissous
Cl ₂	Chlore gazeux
ClO ₂	Bioxyde de chlore
CT _{effectif}	Dose effective de désinfectant à laquelle un microorganisme est exposé. Cette dose est décrite par l'aire sous la courbe de décroissance du désinfectant.
CT _{lag}	Dose de désinfectant (en mg•min/L) requise pour dépasser la phase initiale de latence observée pour certains microorganismes
CT-x log	CT requis pour inactiver x log d'un microorganisme donné par un désinfectant donné
HOCl	Acide hypochloreux
k	Taux d'inactivation (mg ⁻¹ min ⁻¹ •L) durant la phase exponentielle de la courbe d'inactivation
K	Degré Kelvin
K _a	Taux d'inactivation des organismes sous forme d'agrégats
K _s	Taux d'inactivation des organismes individuels
IDDF	<i>Integrated Disinfection Design Framework</i>

LT2SWTR	Long Term 2 Surface Water Treatment Rule – réglementation américaine en cours d'implantation
m	Coefficient du modèle de HOM permettant de décrire les phénomènes de <i>tailing</i> et de latence
n	Coefficient de dilution des modèles de Chick-Watson et Hom permettant de décrire l'importance relative du temps de contact et de la concentration sur la cinétique d'inactivation
MS2	Espèce de virus coliphages dont l'hôte est <i>E. coli</i>
N	Concentration de microorganismes survivants au temps t
No	Concentration initiale de microorganismes
NH ₂ Cl	Monochloramine
NOM	Matière organique naturelle
O ₃	Ozone dissous
OCl ⁻	Ion hypochlorite
PFU	Plaque forming unit
USEPA	Agence de protection environnementale américaine
UFC	Unité formatrice de colonies
r	la fraction de la population sous forme d'agrégats, $0 \leq r \leq 1$
T	Température ou temps de contact, selon le contexte
T ₁₀	Temps pour lequel 10% d'un traceur est récupéré à la sortie d'un bassin de contact. Valeur utilisée pour le calcul du CT en usine.
THM	Trihalométhanes
TOX	Total Organics Halides
UTN	Unité de turbidité néphélométrique

CHAPITRE 1

INTRODUCTION

1.1 MISE EN CONTEXTE

Le début des recherches dans le domaine de la désinfection des eaux est généralement retracé à la fin du 19^{ème} siècle avec la démonstration de l'effet germicide des hypochlorites par Koch en 1881 et l'observation des effets favorables de la chloration en Angleterre. L'étude de la désinfection est donc un domaine de recherche très vaste englobant plus d'un siècle de publications scientifiques. Évidemment, l'importance de cette thématique par rapport au progrès de la société est manifeste et, encore aujourd'hui, l'accès à l'eau potable demeure un des critères de base pour évaluer le niveau de développement d'une société.

Les premiers travaux dans le domaine de la désinfection se sont surtout penchés sur la capacité de la chloration et de la filtration à respectivement inactiver ou atténuer les concentrations de coliformes et de bactéries hétérotrophes aérobies. Déjà en 1908, Chick, et puis Watson, établissaient ce qui allait devenir les fondements de la loi mécanistique décrivant l'inactivation des micro-organismes : la loi de Chick-Watson. Parallèlement à ces travaux, la généralisation de la chloration et de la filtration des eaux a grandement contribué à réduire l'incidence des épidémies d'origine hydrique. De nos jours, la chloration est encore le mode de désinfection le plus courant puisque environ 70% des systèmes communautaires l'utilisaient en 1995 comme post-désinfectant (USEPA, 1999).

Les contraintes associées à la chloration furent cependant reconnues assez tôt dans l'histoire, en particulier en ce qui concerne l'effet de la demande en chlore de l'eau à désinfecter (Wolman et Enslow, 1919 ; d'après White, 1999) et puis la découverte de la chloration au point de rupture en 1939 (Griffin, 1939 ; d'après White, 1999).

Les premiers travaux sur la chloration de Butterfield, Chang, Fair et Morris durant les années quarante sont des incontournables dans le domaine et marquent à notre avis le début de l'époque moderne de la recherche sur la désinfection des eaux potables. On doit d'ailleurs :

- à Butterfield, la première étude de l'efficacité relative HOCl/OCl^- ,
- à Fair (1948), la modification au modèle de Chick-Watson (qui allait être plus tard reconnue comme le modèle de Hom)
- à Chang (1961), la découverte de la protection des micro-organismes par occlusion à l'intérieur d'organismes supérieurs (coliformes à l'intérieur des nématodes dans ce cas spécifique), et,
- à Morris (1966), le développement des constantes d'équilibre entre l'acide hypochloreux et l'ion hypochlorite.

Lors des trois décennies suivantes (1950-1960-1970), la recherche sur la désinfection des bactéries a été occultée par les travaux démontrant la plus grande résistance des virus à la désinfection. La première étude d'inactivation des virus (*coxsackievirus* A2) en conditions contrôlées est attribuée à Clarke et al. (1954). Les travaux sur le sujet furent par la suite abondants et on dénombre quelques dizaines de publications sur le sujet, en particulier durant la décennie 70.

Les années quatre-vingt virent l'émergence d'agents pathogènes, les parasites enkystés *Giardia* et *Cryptosporidium*, encore plus résistants que les virus. Cette escalade en terme d'organismes résistants à la désinfection signifiait implicitement qu'il fallait hausser les doses de désinfectant afin d'assurer la production d'une eau potable désinfectée. Cependant, Rook (1974) avait contribué à faire connaître l'existence des trihalométhanes (THM), une famille de sous-produits de chloration soupçonnés cancérogènes. Cette découverte a forcé un questionnement sur la zone optimale permettant de fournir un équilibre adéquat entre le besoin d'une part de désinfecter

l'eau et d'autre part de limiter la formation des sous-produits de désinfection potentiellement cancérogènes.

Bien que ce dilemme ne soit pas encore entièrement résolu à ce jour, il est couramment accepté par les autorités réglementaires que la désinfection doit primer sur le contrôle de la formation de sous-produits. L'importance de diminuer le risque microbiologique demeure donc à ce jour l'objectif prioritaire du traitement des eaux potables. Cependant, cette démonstration est de plus en plus remise en question de telle sorte que, en 2003, le contrôle des sous-produits de désinfection est toujours un sujet d'actualité. En effet, l'analyse de risque sur les sous-produits de désinfection implique nécessairement plusieurs hypothèses. Or, plusieurs nouvelles données scientifiques ont ébranlé ce paradigme au cours des cinq dernières années. Nous résumons ces principales conclusions ci-après.

1. *Exposition aux THM* : le modèle traditionnel exclut l'exposition liée à la volatilisation des THM durant la prise d'un bain ou d'une douche. L'exposition durant la baignade en piscine est également un facteur confondant. Or, ces expositions sont loin d'être négligeables et peuvent en fait s'avérer plus importantes que la consommation d'eau chlorée (Kuo et al., 1998; Arbuckle et al., 2002).
2. *Réconciliation avec les études épidémiologiques* : les études épidémiologiques indiquent des niveaux de risque 100 à 10 000 fois plus élevés que les extrapolations faites à partir d'études toxicologiques animales (Odom et al., 1999), qui pourtant incluent des facteurs de sécurité allant de 100 à 10 000.
3. *Effets sur le bon déroulement de la grossesse* : La réglementation sur les THM a été calibrée de façon à minimiser le risque de cancer dans la population exposée. Récemment, les preuves scientifiques s'accumulent à l'effet que certains sous-produits du chlore pourraient accroître la fréquence des malformations congénitales, des avortements spontanés, des bébés mort-nés et entraîner une diminution du poids des nourrissons à la naissance (Aschengrau et al., 1989; Kramer et al., 1992; Bove

et al., 1995; Savitz et al., 1995; Gallagher et al., 1998; Waller et al., 1998; Swan et al., 1998; Correa et al., 1999; Dodds et al., 1999; Klotz et al., 1999; Magnus et al., 1999; King et al., 2000; Yang et al., 2000, Bielmeier et al., 2001). Plus récemment, la consommation d'eau chlorée a également été liée à une réduction de la durée du cycle menstruel (Wyndam et al., 2003), ce qui suggère que certains sous-produits de désinfection puissent agir comme perturbateurs endocriniens. Il va sans dire que toutes ces informations pèsent lourdement au moment d'établir les normes, particulièrement en raison du modèle de risque utilisé, lequel pondère de façon plus importante les effets se produisant tôt dans le cycle de la vie.

Compte tenu de ces informations, il apparaît peu probable que les considérations sanitaires sur l'ingestion de sous-produits de désinfection seront revues à la baisse dans le futur. Évidemment, la solution la plus simple pour réduire l'exposition aux sous-produits de désinfection consiste à réduire les doses de désinfectant appliquées. À cet égard, les exigences de désinfection édictées par la réglementation américaine (USEPA, 1989) incorporent des facteurs de sécurité allant de 1.0 (aucune sécurité) à 3.0. De plus, la méthode de calcul de la dose de désinfectant (CT) est volontairement conservatrice. Il existe donc une fenêtre d'opportunité afin de réduire les doses de désinfectant actuellement utilisées pour la désinfection des eaux potables. Cependant, il est essentiel de confirmer l'effet des caractéristiques des eaux naturelles sur l'efficacité de la désinfection. En effet, malgré un siècle de recherche sur la désinfection des eaux potable, les connaissances sur la désinfection en eaux naturelles demeurent limitées puisque la quasi-totalité des études en eaux potables ont porté sur la désinfection de micro-organismes indicateurs inactivés dans des eaux synthétiques. Or, la révision des facteurs de sécurité passe obligatoirement par de meilleures connaissances dans ce domaine. Cette prémisse est l'argument central justifiant cette étude doctorale.

1.2 ORGANISATION DE LA THÈSE

La présente thèse est subdivisée en cinq parties. Dans le prochain chapitre, on s'attardera à effectuer un survol des connaissances acquises à ce jour dans le domaine d'étude des interactions de la qualité de l'eau sur l'efficacité de la désinfection (Chapitre 2). Par la suite, on établira les objectifs de ce projet et présentera également les détails de la démarche expérimentale employée (Chapitre 3). Les trois chapitres suivants (4-6) sont constitués d'autant d'articles scientifiques décrivant le cœur de ce projet. Les chapitres 4 et 5 étudient les effets de la qualité de l'eau sur l'efficacité de la désinfection au chlore et au bioxyde de chlore, respectivement. Ces essais ont tous été réalisés en eaux synthétiques, *i.e.* des eaux reconstituées au laboratoire à l'aide d'argiles, de sels minéraux et de matière organique lyophilisée. Les effets observés en eaux synthétiques ont été confirmés par des essais additionnels en eaux naturelles non traitées en provenance de quatre installations canadiennes et américaines de traitement de l'eau potable (Chapitre 6). Enfin, le chapitre 7 offre une synthèse de l'ensemble de ces travaux.

CHAPITRE 2

REVUE DE LITTÉRATURE

Compte tenu de l'ampleur du domaine d'étude, la présente revue bibliographique se limite aux travaux portant sur l'influence de la qualité de l'eau sur l'efficacité de la désinfection. Par conséquent, les aspects touchant à l'influence de l'état physiologique des microorganismes sur leur résistance à la désinfection ne sont pas abordés. Similairement, l'impact des techniques analytiques (notions de viabilité) n'est pas traité dans ce document. De plus, le travail a été recentré sur deux des principaux désinfectants utilisés dans le traitement de l'eau potable : le chlore et le bioxyde de chlore. Cette revue sera terminée par des considérations liées à la modélisation du phénomène de la désinfection afin de faire ressortir les lacunes historiques en la matière.

2.1 LE CHLORE: LA RÉFÉRENCE DANS LE DOMAINE DE LA DÉSINFECTION

2.1.1 Généralités

Le chlore est un gaz de couleur jaune-verte à la température de la pièce. Son potentiel redox est de 1.4 V à 25°C. Une fois en solution, le chlore gazeux s'hydrolyse pour former de l'acide hypochloreux (HOCl) et des ions hypochlorites (OCl⁻). Son utilisation pour la désinfection des eaux est très répandue, si bien qu'on estime que plus de 200 millions de personnes sont alimentées quotidiennement avec de l'eau chlorée aux États-Unis (CCC, 2003).

2.1.2 Mécanismes d'inactivation

Malgré le nombre élevé d'études portant sur les mécanismes d'inactivation des bactéries (Fair et al., 1947 ; Green et Stumpf, 1946 ; Wyss, 1962), des parasites (Chang

et al., 1944) et des spores (Fair et al., 1947, Marks et al., 1945), les phénomènes en jeu lors de la chloration ne sont pas entièrement définis (White, 1999). Cependant, il est généralement accepté que l'efficacité bactéricide du chlore est fonction de la concentration active de désinfectant transférée à travers la paroi cellulaire. Une fois cette étape complétée, le chlore attaque non seulement la membrane cytoplasmique mais également les structures internes dont les groupes enzymatiques incluant les fonctions soufrées. Ainsi, la chloration affecte autant la respiration cellulaire que l'intégrité de l'ADN et l'ARN (Haas et Engelbrecht, 1980). Cette dernière attaque est d'ailleurs observable lorsqu'on énumère des bactéries chlorées après marquage en épifluorescence. Une diminution de la fluorescence est alors notée (Saby et al., 1997; Boulos et al., 1999).

Initialement, dans les années 40, la principale théorie (Green et Stumpf, 1946 ; Knox et al., 1948) voulut que le chlore détruisît les groupes sulfhydriles, ce qui interférerait avec le système enzymatique. Cependant, au vue des travaux des cinquante dernières années, il apparaît que l'action du chlore est beaucoup plus variée et peut se résumer en trois modes d'action: (i) destruction de l'intégrité structurale (Kulikovsky et al., 1975), (ii) interférence avec les processus enzymatiques (Venchobacar et al., 1977) et (iii) endommagement du code génétique (Shih et Lederberg, 1976).

En ce qui concerne les virus, le mode d'action supposée est l'endommagement du code génétique et la destruction de la capsid (Oliveri et al., 1975). Dans les deux cas, les réactions de dénaturation des protéines formant la capsid sont plus lentes que la destruction du système enzymatique bactérien, ce qui explique la plus grande résistance des virus à la chloration. En ce qui concerne la très grande résistance des parasites enkystés tels que *Giardia*, les premiers travaux sur les modes d'action du chlore sont attribués à Chang qui étudiait *E. histolytica* en 1944. La grande résistance des parasites s'explique par la résilience de la paroi des kystes à l'action chlore. Cette théorie est encore aujourd'hui l'explication acceptée par la communauté scientifique.

2.1.3 Caractéristiques de l'eau influençant l'efficacité de la chloration

Plusieurs facteurs environnementaux influencent l'efficacité de la chloration. De façon synthétique, ces facteurs peuvent être regroupés en trois classes selon le phénomène sur lequel ils agissent, soit (i) l'activité chimique du désinfectant, (ii) la disponibilité du désinfectant en solution ou (iii) l'accessibilité du désinfectant au microorganisme visé. À titre d'illustration de ce concept, la figure 2-1 résume ces trois classes avec l'exemple de l'inactivation du virus de Norwalk par le chlore. Dans un tel cas, la molécule de chlore sera plus ou moins active selon la force ionique, le pH ou la température. La disponibilité du chlore libre sera compromise par la demande en chlore et, enfin, l'accessibilité au virus sera défavorisée par la présence, par exemple, de particules.

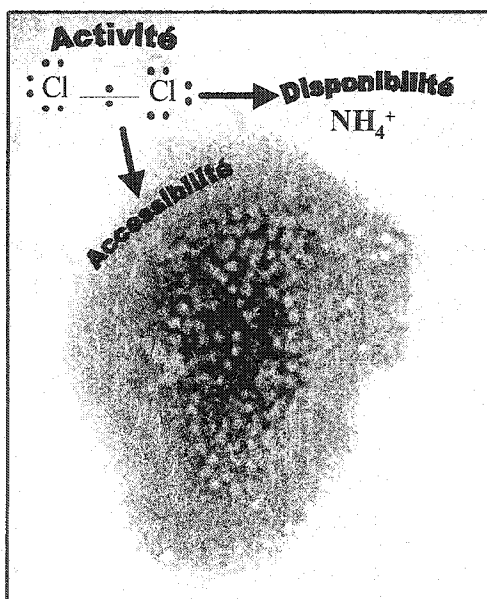


Figure 2-1: Illustration conceptuelle des trois phénomènes à la base de l'influence des caractéristiques de l'eau sur l'efficacité de la désinfection d'un virus de Norwalk. Source de l'image: Wadsworth Center of the New York State Department of Health.

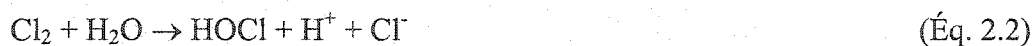
Dans le cadre de la présente revue de littérature, cette classification a été retenue et on discutera donc successivement de l'importance relative de ces trois phénomènes.

2.1.3.1 Facteurs influençant l'activité chimique du chlore

L'acide hypochloreux est un acide faible qui subit une dissociation partielle en fonction du pH de l'eau, telle que :



Indépendamment de la source de chlore utilisée pour la désinfection (gazeux ou solution d'hypochlorites), un équilibre est atteint entre les ions hypochlorites (OCl^-) et l'acide hypochloreux (HOCl) selon le pH de la solution. Le chlore gazeux s'hydrolyse selon l'équation suivante :



Par conséquent, l'emploi du chlore gazeux abaissera le pH de l'eau en raison de la présence de l'ion hydrogène (H^+). Par opposition, les solutions d'hypochlorites (eau de Javel) vont favoriser l'augmentation du pH puisque ces solutions sont maintenues à pH basique parce qu'elles sont alors plus stables.

Le pH, la force ionique et la température de l'eau viendront tous influencer l'activité du chlore. Par contraste avec les autres désinfectants traditionnels (O_3 , ClO_2 , NH_2Cl), le pH a un effet majeur sur l'efficacité du chlore. Cet impact est connu depuis plusieurs décennies ; Butterfield et al. (1943) ayant été le premier à étudier ce phénomène en laboratoire. Tel que discuté précédemment, le pH influence la distribution relative d'acide hypochloreux et d'ions hypochlorites. Or, ces deux molécules offrent des pouvoirs désinfectants forts différents, l'acide hypochloreux étant de beaucoup supérieur aux ions hypochlorites. La supériorité de l'acide hypochloreux ne peut pas seulement être expliquée par la différence de potentiel redox entre ces deux oxydants (1490 vs 900 mV). En effet, la charge négative de l'ion hypochlorite lui est défavorable en raison du fait que les micro-organismes sont chargés négativement dans l'eau. Ce facteur explique l'activité limitée des ions hypochlorites (Cramer et al., 1976, Block,

1982). Il est d'ailleurs intéressant de mentionner qu'à pH élevé (> 10), cet effet peut être atténué par la présence de cations (Na^+ , Li^+ , K^+); Ce phénomène, connu sous l'appellation d'effet d'ions appariés (*paired ions effects*), a été décrit la première fois par Sugam et Helz (1976). Le résultat net est un désinfectant ayant une activité chimique intermédiaire à l'acide hypochloreux et à l'ion hypochlorite.

La distribution relative de l'acide hypochloreux par rapport aux ions hypochlorites peut être calculée selon l'équation suivante :

$$\frac{(\text{HOCl})}{(\text{HOCl}) + (\text{OCl}^-)} = \frac{1}{1 + K_i \frac{1}{(\text{H}^+)}} \quad (\text{Éq. 2.3})$$

$$\text{avec: } K_i = \frac{(\text{H}^+) \cdot (\text{OCl}^-)}{(\text{HOCl})} \quad (\text{Éq. 2.4})$$

où K_i : la constante d'ionisation, variant selon la température, tel que décrit par Morris (1966):

$$pK_i = \frac{3000}{T} - 10,0686 + 0,0253 \cdot T \quad (\text{Éq. 2.5})$$

avec T, la température en degrés Kelvin.

Il est donc possible de calculer à l'aide de ces équations la proportion d'acide hypochloreux pour différents pH et températures. Selon la figure 2-2, la présence d'ions hypochlorites est négligeable pour un pH inférieur à 6.0 alors qu'ils sont essentiellement la seule entité chimique présente pour un pH supérieur à 9.0. Pour un pH donné, une diminution de température favorisera par ailleurs la présence d'acide hypochloreux.

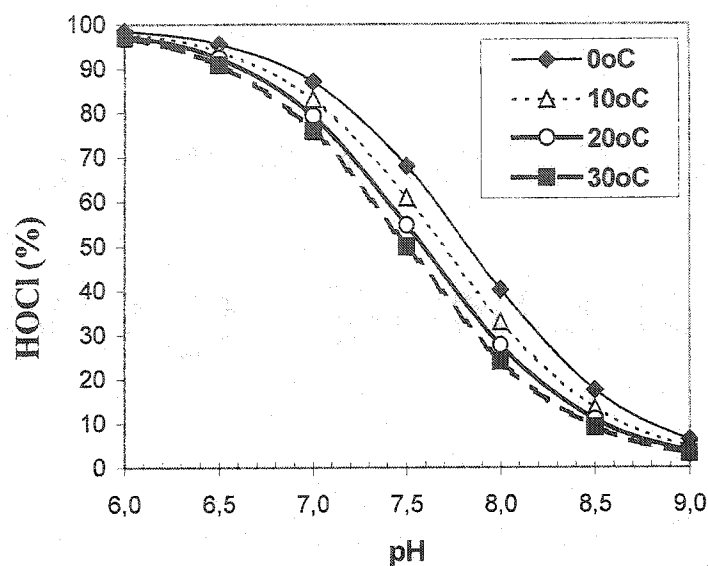


Figure 2-2: Distribution relative de l'acide hypochloreux selon la température et le pH de l'eau. Adapté de Morris (1966).

Cependant, selon le pH, l'effet de température peut être négligeable. L'impact maximal est observé à un pH de 7.5 pour lequel une diminution de la température de 20°C à 0.1°C augmentera la proportion d'acide hypochloreux de 15%.

Grâce à cette relation, il est possible de calculer l'efficacité relative de ces deux entités chimiques en terme de désinfection pour différentes données tirées de la littérature scientifique. Pour un pH donné, nous faisons l'hypothèse que l'inactivation peut être décrite par la somme des inactivations induites par l'acide hypochloreux et les ions hypochlorites, de telle sorte que :

$$Inactivation = k_1 \cdot C_{HOCl} \cdot t + k_2 \cdot C_{OCl^-} \cdot t \quad (\text{Éq. 2.6})$$

Plusieurs publications scientifiques fournissent les inactivations observées pour deux pH différents. Il est alors possible de résoudre l'équation 2-6 sous la forme d'un système de deux équations linéaires (en utilisant l'équation 2-3 pour obtenir la

concentration théorique des entités chimiques du chlore). Le fruit de ce travail est présenté au tableau 2-1.

Selon le tableau 2-1, l'efficacité relative de l'acide hypochloreux par rapport aux ions hypochlorites est influencée par l'organisme étudié. Pour *Giardia*, cette efficacité relative est plutôt faible (2.5-9.7), à l'opposé des virus et des bactéries pour lesquels des ratios typiques de 10 à 50 sont calculés. Un tel ratio est difficile à calculer pour *Cryptosporidium* en raison de l'impossibilité de mesurer une inactivation significative pour un pH supérieur à 8 (Gyürek et al., 1997). L'efficacité relative HOCl/OCl^- pour l'inactivation des spores bactériennes est du même ordre de grandeur que pour *Giardia*, soit 2.7 à 12. La grande résistance des spores et des kystes provient de leur capacité à limiter la diffusion du chlore jusqu'à l'intérieur de la spore ou du kyste. Ce phénomène est probablement moins influencé par les variations de pH que les réactions d'oxydation des protéines des virus ou des systèmes enzymatiques bactériens.

Un nombre limité d'études a également démontré de meilleures inactivations à pH élevés pour les virus (Scarpino et al., 1972; Engelbrecht et al., 1980), des bactéries (Haas et Zapkin, 1981; Sobsey, 1989) ou les kystes de *Giardia* (Leahy et al., 1987; d'après USEPA, 1989). Tel que discuté précédemment, cet effet est généralement attribuable à l'impact du sodium ou du potassium, lequel peut accroître le taux d'inactivation des hypochlorites (Sugam et Helz, 1976), quoique Rubin et al. (1989) mentionne également l'accroissement de la perméabilité de la paroi des kystes pour expliquer ce phénomène atypique. La théorie de Haas et Zapkin (1981) paraît la plus plausible compte tenu que la plupart des études sur la désinfection utilisaient des eaux salines ou des tampons de phosphate de potassium. Par conséquent, les études au tableau 2.1 pour lesquelles des données ont été obtenues à $\text{pH} > 10.0$ doivent être évaluées avec prudence.

Tableau 2-1: Efficacité relative de l'acide hypochloreux par rapport aux ions hypochlorites.

Organismes	Temp. (°C)	pH	Ct (min•mg/L)	Inactivation (Log)	Efficacité relative HOCl/OCl ⁻	Références
Spoires et bactéries						
<i>B. cereus</i> sp.	5	6	78	2	2.7	Finch et al., 1999b
	5	8	78	1		
<i>B. subtilis</i> sp.	7-22	6.5 8.3	-	-	7@12	Barbeau et al., 2002
<i>E. coli</i>	20-25	7/8.5 /9.8	-	2	60-70	Butterfield et al., 1943
<i>E. coli</i>	25	7	Ca. 3	4.7	0.49	Sobsey, 1989
	23	10	Ca. 0.35	1		
<i>E. coli</i>	5	6	-	-	50	Scarpino et al., 1972
	5	10	-	-		
<i>E. coli</i>	11	6	≈ 0.10	2	8.3	Ross et al., 1975
	11	10	≈ 0.83	2		
Parasites						
<i>Giardia</i>	20	6	39	3	3.3	
		9	117	3		USEPA, 1991
<i>N. gruberi</i>	25	5	7.3	2	25	Rubin et al., 1983
	25	9	177	2		
<i>Giardia muris</i>	5	6	150	3		Hibbler et al., 1987
	5	7	300	3	9.7	
<i>Giardia muris</i>	5	8	119	0.5		Finch et al., 1999b
	5	6	57	0.7	4.3	
<i>Giardia lamblia</i>	5	6	54-87	2	3.8	Sobsey, 1989
	5	8	119-192	2	(2.5 – 5.1)	
Virus						
<i>MS2</i>	5	6	Ca 0.25	4	52	Sobsey, 1989
	5	10	Ca 6.9	4		
<i>MS2</i>	7	6.5- 8.5	0.17 3.0	2 2	50	Barbeau, 2002
<i>Coxsackie B3</i>					≈ 30	Jensen et al., 1980
<i>Hepatitis A</i>	5	6	≈ 1.8	4	≈ 6.8	Sobsey, 1989
	5	10	≈ 12.3	4		
<i>Coxsackie A9</i>	5	6/10	N.A.	2	5	Adapté de SWDC et al., 1977
<i>Echo1</i>	5	6/10	N.A.	2	192	
<i>Polio</i>	5	6/10	N.A.	2	53	
<i>Echo5</i>	5	6/10	N.A.	2	21	
<i>Polio1</i>	5	6/10	N.A.	2	10	
<i>Coxsackie B5</i>	5	6/10	N.A.	2	19	

Ca = Calculée selon les données publiées

Mis à part le pH et la force ionique, la température est un facteur important influençant l'activité du chlore. La désinfection basée sur l'oxydation, telle la

chloration, peut être décrite par une relation de type Van't Hoff-Arrhénius (Faust et Aly, 1998), ce qui est cohérent avec des phénomènes contrôlés par la diffusion et/ou par la réaction avec des enzymes. Cette relation est décrite par l'équation suivante :

$$\frac{k_{T2}}{k_{T1}} = \exp \left[\frac{E_a}{R} \times \left(\frac{1}{T_1} - \frac{1}{T_2} \right) \right] \quad (\text{Éq. 2.7})$$

où T_1, T_2 = températures (en Kelvin)
 k_{T1}, k_{T2} = coefficient de mortalité ($\text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{L}$)
 E_a = énergie d'activation (kJ/mole)
 R = la constante d'un gaz idéal, 1,9872 kJ/mol K

Cette relation a été confirmée par un nombre incalculable d'études et nous nous limiterons ici à mentionner les travaux récents de Rennecker et al. (2000), Ruffell et al. (2000) et Driedger et al. (2001) qui ont confirmé expérimentalement pour différents désinfectants, tels que l'ozone, le bioxyde de chlore, les monochloramines et l'ozone, que l'effet de la température obéit à une loi d'Arrhénius.

D'autre part, il est devenu pratique courante dans le domaine de la désinfection de rapporter l'effet de température en terme du facteur multiplicatif requis au niveau de la dose (CT) pour pallier une baisse de température standardisée de 10°C. Ce facteur, aussi appelé Q_{10} , permet de comparer les résultats de différents chercheurs. Cette approche a été utilisée pour préparer le tableau 2-2 qui synthétise plusieurs références dans le domaine.

Les valeurs de Q_{10} obtenues de la littérature varient dans une plage de 1.4 à 5.7, selon l'organisme étudié. Il est aussi intéressant de noter que le pH influence la valeur du Q_{10} . Un pH élevé favorise une grande dépendance à la température (*i.e.* un Q_{10} élevé). Par exemple, Fair et al. (1948) ont observé une augmentation du ratio de 1.42 à 2.50 pour l'inactivation de *E. coli* suite à une hausse du pH de 8.5 à 10.3. Similairement, les travaux de Butterfield et al. (1943), également sur *E. coli*, indiquent une augmentation du Q_{10} de 3.03 à 4.42 pour une hausse de pH de 8.5 à 10.7. Ce phénomène suggère que les ions hypochlorites et l'acide hypochloreux sont soumis à

des énergies d'activation distinctes (cf. E_a dans Eq. 2.7). Il est par ailleurs étonnant que ce phénomène ne soit pas inclus dans les tables de CT de la USEPA (1989). De plus, à notre connaissance, cette observation n'a fait l'objet d'aucune étude systématique par le passé.

Tableau 2-2: Comparaison de l'effet de la température (Q_{10}) sur l'efficacité de la chloration pour différents microorganismes

Organismes	Q_{10}	pH	Références
Parasites			
<i>Giardia</i>	2.0	pH = 6 to 9	USEPA, 1991
<i>Cryptosporidium parvum</i>	2.5 - 2.7	pH = 6	Corona-Vasquez et al., 2000
<i>Cryptosporidium parvum</i>	2.6	pH = 6	Rennecker et al., 2000
Bactéries/spores			
<i>Bacillus subtilis spores</i>	1.7	pH = 7	Barbeau et al., 1999
<i>Bacillus cereus spores</i>	1.5	pH = 6	Finch et Choe, 1999a
<i>Bacillus globigii spores</i>	2.32	pH = 6.2-8.6	Brazis et al., 1958
<i>Bacillus anthracis spores</i>	2.25	pH = 6.2-8.6	Brazis et al., 1958
<i>Bacillus metiens spores</i>	2.71	pH = 10	Butterfield et al., 1943 de Haas and Karra 1984
<i>Escherichia coli</i>	3.03	pH = 8.5	Butterfield et al., 1943, tiré de
	4.74	pH = 9.8	Haas and Karra 1984
	4.42	pH = 10.7	
<i>Escherichia coli</i>	1.42	pH = 8.5	Fair et al., 1948, tiré de Hoff,
	2.13	pH = 9.8	1986
	2.50	pH = 10.7	
Virus			
<i>Parvovirus- H1</i>	1.6	pH = 7	Churn et al., 1984 de Sobsey, 1989
<i>Hepatitis A</i>	2.0	pH = 6-9	USEPA, 1989
<i>Poliovirus (Mahoney)</i>	3.06	pH = 6	Floyd et al., 1979, tiré de Haas et Karra 1984

Note: Q_{10} = Facteur multiplicatif du CT pour une baisse de 10°C.
Valeurs calculées selon les données publiées.

Nous concluons cette section en notant que les études antérieures ayant analysées l'effet du pH, de la température et de la force ionique se caractérisent en très grande

majorité par (i) l'utilisation d'eaux reconstituées, (ii) l'étude d'un nombre relativement limité d'organismes (au mieux une trentaine pour l'ensemble de la littérature scientifique) et (iii) un manque d'intérêt pour les interactions potentielles entre les variables (pH - température, par exemple).

2.1.3.2 Facteurs influençant la persistance du chlore en solution

Pour qu'un procédé de désinfection soit efficace, il est évidemment nécessaire que la molécule de désinfectant puisse atteindre l'organisme visé. Or, plusieurs composés chimiques organiques et inorganiques peuvent nuire à cette étape en consommant le désinfectant avant même qu'il n'entre en contact avec le microorganisme.

La concentration de désinfectant consommée au cours de ces réactions est appelée la demande en chlore. Cette dernière augmente avec le temps puisque plusieurs de ces réactions sont lentes. Dans le cas du chlore, les composés les plus fréquemment responsables de la demande en chlore des eaux de surface et des eaux souterraines incluent : (i) la matière organique naturelle, (ii) l'ammoniaque, (iii) les sulfures, (iv) les nitrites, (v) le fer et le manganèse. Du point de vue de la désinfection, il est certain qu'une forte demande en chlore impliquera une augmentation du dosage de chlore afin de maintenir une efficacité de désinfection équivalente. Dans un tel cas, le principal défi est d'arriver à maintenir une concentration de chlore libre résiduelle pour une période de temps suffisante pour garantir le CT visé. Si cette condition est atteinte, la désinfection sera assurée à moins que les microorganismes ne fussent protégés par des particules.

Dans le cas du chlore, l'interférence notable causée par l'ammoniaque mérite d'être relevée. Cette caractéristique est d'autant plus problématique que la présence d'ammoniaque dans une eau de surface est souvent indicatrice d'une pollution fécale récente. La chloration d'une eau contenant de l'azote ammoniacal entraînera la formation de chloramines, dont le pouvoir désinfectant est limité (SDWC et al., 1977).

En effet, l'efficacité de ces dernières est de beaucoup inférieure à celle de l'acide hypochloreux pour l'inactivation des microorganismes en suspension. Pour de plus amples informations concernant les effets de l'azote ammoniacal durant la chloration, le lecteur est prié de se référer à White (1992).

Bien que la persistance du chlore libre soit une variable essentielle au maintien d'une bonne désinfection des eaux, cette contrainte est en pratique connue des exploitants. En effet, les réglementations américaine, québécoise, albertaine et ontarienne imposent toutes le principe du CT comme moyen de contrôle de la désinfection. Selon ce principe, l'efficacité de la désinfection est garantie en maintenant une concentration résiduelle de désinfectant (C) pendant un certain temps de contact (T_{10}) (USEPA, 1989). Cette pratique se veut conservatrice compte tenu que la dose microbiologique effective (McGrath et Johnson, 1979) est plutôt équivalente à l'aire sous la courbe de décroissance, soit :

$$CT_{\text{effectif}} = \int_0^t C(t) \cdot dt \quad (\text{Éq. 2.8})$$

où $C(t)$ est une fonction décrivant la décroissance du chlore.

Dans la littérature scientifique, l'interférence des substances réductrices ne semble pas avoir été suffisamment étudiée. Par exemple, aucune information n'est mentionnée sur l'effet favorable/défavorable de la matière organique naturelle sur la désinfection, exception faite de sa consommation anticipée de chlore libre. Par ailleurs, pendant plusieurs décennies, les travaux de désinfection ont volontairement été complétés dans des eaux tamponnées sans demande en oxydant. Il faut attendre la fin des années soixante (Carlson et al., 1968) pour voir les premiers travaux en eau potable¹ utilisant des eaux naturelles et portant sur l'interférence de la turbidité inorganique et organique sur l'efficacité de la désinfection. La turbidité organique employée était cependant

¹ plusieurs travaux existaient déjà dans le domaine de la désinfection des eaux usées.

constituée de matières fécales ou encore de débris cellulaires, des conditions qui ne s'apparentent pas à la matière organique naturelle.

2.1.3.3 Facteurs influençant l'accessibilité du chlore au microorganisme visé

Nombreuses sont les études ayant étudiées l'effet protecteur des particules (ou de la turbidité) durant la chloration (Carlson et al., 1968; Stagg et al., 1972; Boardman et Sproul, 1977; Hoff, 1978 ; Stagg et al., 1978; Hejkal et al., 1979; LeChevallier et al., 1981; Ridgway et al., 1982; Camper et al., 1986; Berman et al., 1988; Herson et al., 1987; Stewart et al., 1990; Stringfellow et al., 1993; Clark et al., 1994; Haas et al., 1995; Kaneko, 1998; Gauthier et al., 1999). Il est cependant à noter que plusieurs de ces travaux ne sont pas basés sur le concept de CT_{effectif} , ce qui limite la portée de leurs conclusions puisqu'il est alors difficile de distinguer l'effet d'accroissement de la demande en chlore de l'effet de protection physique, tous deux induits par la turbidité. Néanmoins, ces démonstrations ont fait en sorte que la turbidité est, encore de nos jours, utilisée dans la plupart des réglementations comme indicateur indirect de la qualité de l'eau. Aux États-Unis, une limite supérieure de 5 UTN est d'ailleurs exigée pour les eaux de surface non filtrées (USEPA, 1989) afin de garantir l'efficacité de la désinfection. En comparaison, une turbidité supérieure à 1 UTN pour une eau souterraine entraîne la nécessité par l'exploitant québécois de démontrer l'efficacité de sa désinfection (article 25, Québec, 2001). Il ne faut cependant pas confondre ces valeurs de turbidité (1 ou 5 UTN) avec les exigences de turbidité pour des eaux filtrées (< 0.3 UTN, 95% du temps) qui sont incluses à des fins d'évaluation de la performance du traitement physico-chimique pour l'abattement des organismes résistants à la désinfection.

Historiquement, la majorité des travaux initiaux sur le sujet ont étudié l'inactivation des virus. Ces travaux ont eu lieu dans les années soixante-dix alors que les virus étaient alors considérés comme les organismes les plus résistants à la désinfection.

Ainsi, ces travaux ont mené aux conclusions suivantes :

- Stagg et al. (1972) ont observé que des bactériophages adsorbés sur des particules d'argile étaient deux fois plus résistants au chlore que les virus en suspension. Carlson et al. (1968) avaient été les premiers à observer ce phénomène.
- Stagg et al. (1977) et Hejkal et al. (1979) ont observé qu'une souche de poliovirus associée à des matières fécales était protégée de l'action des chloramines. Scarpino et Hoff (1984) ont observé le même phénomène pour *E. coli* et poliovirus.

Ridgway et al. (1982) ont démontré que la vaste majorité des bactéries viables retrouvées dans l'eau potable sont associées à des particules. Non seulement bénéficient-elles alors d'une protection physique des particules, mais elles peuvent également supporter leur croissance si la particule est d'origine organique (Zobell, 1943). Or, environ 50% des particules récupérées dans l'eau traitée sont d'origine organique selon Gauthier et al. (2001).

Les bactéries associées aux particules de charbon actif sont plus difficiles à inactiver que les mêmes bactéries en suspension (LeChevallier et al., 1984; Camper et al., 1986; Stewart et al., 1990; Stringfellow et al., 1993), ce qui n'apparaît guère surprenant compte tenu de la capacité réductrice du charbon actif. Pour leur part, Herson et al. (1987), observent qu'une souche d'*Enterobacter cloacae* est protégée du chlore lorsqu'elle est associée à des dépôts de fer et manganèse (tous deux consommateurs de chlore). Cependant, LeChevallier et al. (1988a) mentionne que l'attachement d'une souche de *Klebsiella* à des billes de verre accroît sa résistance à la chloration et à la monochloramine. Or, les billes de verre ne consomment pas de désinfectant. Dans ce cas-ci, c'est plutôt la matrice du biofilm qui serait à l'origine de cette résistance accrue. Enfin, Haas et al. (1995) ont également observé une désinfection plus difficile de *Giardia* en eaux naturelles, effet attribué à la turbidité selon eux.

On note également plusieurs études dans la littérature scientifique pour lesquelles aucun effet protecteur des particules n'est observé. Par exemple, Boardman et Sproul (1977) ont démontré que le kaolin, les floccs d'alun et les boues d'adoucissement n'augmentaient pas la résistance du bactériophage T7 à la chloration (dans un système sans demande en chlore). Par ailleurs, Hoff (1978) avait constaté les mêmes résultats pour une souche de poliovirus adsorbée à de la bentonite ou du AlPO_4 . D'autre part, des cellules de *K. pneumoniae* associées à des fines de charbon actif n'ont pas été protégées du chlore (Morin et al., 1996). Similairement, *Sphingomonas* sp., une espèce courante dans les biofilms de réseau de distribution, n'a pas été protégée du chlore malgré son attachement à des particules de goethite (Gauthier et al., 1999).

Globalement, l'ensemble de ces résultats peut paraître contradictoire. Mais en fait, ces différentes études sont généralement consistantes en autant qu'on prenne en compte les mécanismes de protection qui sont en jeu. Les mécanismes de protection originant de l'association des organismes avec des particules sont de trois ordres : (i) réduction de la diffusion du désinfectant à l'intérieur d'un agrégat ou d'un biofilm, (ii) réduction de la surface du microorganisme qui est exposée et (iii) demande en désinfectant causée par la particule. Ce dernier point a été traité à la section précédente et nous avons alors mentionné qu'il constituait un facteur confondant important pour analyser les études sur la désinfection.

En ce qui concerne les deux premiers, il a été observé que l'écoulement à l'intérieur des agrégats est laminaire, voire stagnant (Matson et Characklis, 1976 ; DeBeer et al., 1994; DeBeer et al., 1996). Les cellules incorporées dans des agrégats ne pourraient alors qu'être inactivées après la diffusion du désinfectant à l'intérieur de l'agrégat (Stewart et Olson, 1992 ; DeBeer et al., 1994). Les bactéries incluses à l'intérieur de larges particules ($>20\mu\text{m}$) sont d'ailleurs mieux protégées puisque la diffusion est inversement proportionnelle au carré du diamètre de l'agrégat (Stringfellow et al., 1993). De plus, la diffusion est limitée par la présence d'exopolymères produit par les

biofilm, ce qui est un facteur bien connu expliquant la difficulté d'inactivation des biofilms (Clark et al., 1994).

Bien que l'on ait jusqu'à maintenant traité de l'association particule-organisme, il va sans dire que l'association organisme-organisme (sous la forme d'agrégats) est également un facteur limitant pour la désinfection. Par exemple, Clark et al. (1994) ont découvert l'existence d'une souche de *Vibrio cholerae* (bactérie responsable du choléra) caractérisée par de larges agrégats très résistants à la chloration. En fait, l'agrégation est un phénomène d'une importance beaucoup plus grande pour la santé publique que l'attachement à des particules inorganiques. Le gain de résistance obtenu par ce phénomène peut être très important, soit de deux à plus de 10 fois les doses requises pour des suspensions monodispersées (Sharp et al., 1976 ; Jensen et al., 1984 ; Scarpino et Hoff, 1984 ; Clark et al., 1994 ; Grant, 1995). En comparaison, Stagg et al. (1972) sont les auteurs ayant observé le plus grand effet négatif causé par des particules inertes (kaolin). Or, cet effet était somme toute modeste, soit une augmentation d'un facteur deux des doses de chlore requises. Par ailleurs, l'agrégation est un état commun pour les microorganismes ; Berg (1973) ayant même démontré que la plupart des virus se retrouvent dans l'environnement sous forme d'agrégats ou adsorbées à des particules d'origines diverses.

Il existe également une autre forme d'association organisme-organisme qui peut interférer avec la désinfection. En effet, certaines bactéries peuvent être entièrement occluses à l'intérieur d'organismes supérieurs, tels que des amibes, des nématodes (Chang et al., 1960 ; Chang, 1961), des crustacées (Tracy et al., 1966), voire même, dans le cas des virus, à l'intérieur d'une bactérie.

En conclusion, nous nous permettrons de citer Hoff (1978), un des chercheurs les plus actifs sur cette problématique, lequel mentionne que la nature de la turbidité est plus importante que la valeur de turbidité, les particules organiques (matières fécales, débris cellulaires) offrant une meilleure protection que les particules inorganiques.

2.2 LE BIOXYDE DE CHLORE: UNE ALTERNATIVE À LA CHLORATION

2.2.1 Généralités

Le bioxyde chlore est un radical libre (configuration : $O=Cl=O\bullet$) stable pour lequel l'atome de chlore est à un niveau d'oxydation (+IV), comparativement à l'acide hypochloreux qui est à un niveau d'oxydation (+I). À 25°C, le bioxyde de chlore est environ 10 fois plus soluble dans l'eau que le chlore (Doré, 1989). Il ne s'hydrolyse pas mais existe plutôt sous forme de gaz dissous dans une gamme de pH de 2 à 10. Tout comme l'ozone, il est très volatil et peut être éliminé simplement par aération. (Doré 1989). Le bioxyde de chlore a un potentiel redox de 0.95 V, soit une valeur supérieure à l'ion hypochlorite (0.9 V) mais inférieur à l'acide hypochloreux (1.4 V).

L'utilisation du bioxyde permet de réduire la formation de composés organo-halogénés (TOX) et ne forme pas de THM. Avantage important sur le chlore, l'azote ammoniacal ne réagit pas avec le bioxyde de chlore et son efficacité est peu (voire pas) influencée par le pH. Pour toutes ces raisons, il est considéré comme une alternative à la chloration. Un sondage de la USEPA (1999) révèle pourtant que seulement 6% des usines traitant des eaux de surface utilisaient alors le bioxyde de chlore comme désinfectant. Cet état de fait s'explique par les coûts supérieurs d'utilisation, une complexité accrue au niveau de l'opération et de la maintenance, la présence de sous-produits (les chlorites) qui limite le dosage maximal possible à environ 1.4 mg/L et l'obligation réglementaire de limiter la concentration résiduelle à moins de 0.8 mg/L.

2.2.2 Mécanismes d'inactivation

Étonnamment, la littérature scientifique portant sur les mécanismes d'inactivation du bioxyde de chlore est pratiquement aussi abondante que celle du chlore. Selon White (1999), le bioxyde de chlore ne désinfecte pas par chloration (*i.e.* par transfert d'un atome de chlore), mais plutôt par un mécanisme de transfert d'un électron lors de sa réduction en chlorites. Toujours selon White (1999), ce mécanisme privilégierait les

molécules organiques riches en donneurs d'électrons. Tout comme la chloration, cette réaction est cependant non spécifique, et plusieurs sites d'action sont donc possibles.

Initialement, Bernarde et al. (1967) ont proposé que l'action du bioxyde de chlore repose sur sa capacité à interférer avec la synthèse des protéines. Cependant, Roller et al. (1980) ont rejeté cette hypothèse en soutenant que l'inhibition observée était insuffisante pour expliquer à elle seule l'inactivation des bactéries.

Berg et al. (1986) a par la suite démontré que le bioxyde de chlore augmentait la perméabilité membranaire de *E. coli*. Il semble que le bioxyde soit beaucoup plus apte à pénétrer la membrane cellulaire que l'acide hypochloreux ou l'ion hypochlorite, possiblement du fait qu'il est présent dans l'eau sous forme de gaz dissous. L'inhibition de la respiration cellulaire a été observée durant cette étude et attribuée à une perte du potentiel transmembranaire. Ces observations sont d'ailleurs cohérentes avec les conclusions de Oliveri et al. (1985) et Gahandbari et al. (1983) sur la réactivité du bioxyde de chlore avec les protéines et les acides gras présents dans la membrane cellulaire.

Alvarez et O'Brien (1982) et Hauchman et al. (1986) ont aussi démontré la faible réactivité envers l'ARN de poliovirus et du bactériophage $\phi 2$, respectivement. En fait, les principaux sites d'action seraient plutôt les protéines (Oliveri et al., 1985) de la capsid et les lipides (Gahandbari et al., 1983). D'ailleurs, il a été démontré que le bioxyde de chlore réagit avec certains acides aminés vitaux, tels que l'histidine, la cystine, la cystéine, la tyrosine et le tryptophane (Masschelein, 1992). C'est d'ailleurs une des principales hypothèses avancées pour expliquer l'inactivation des virus (Noss et al., 1986). Il faut cependant préciser que le bioxyde de chlore est essentiellement réactif vis-à-vis des amines secondaires et tertiaires ou avec des groupements spécifiques, tels que le groupement soufré de la cystine ou le cycle aromatique activé de la tyrosine (Doré, 1989). White (1999) mentionne également que le bioxyde de chlore réagit avec les peptones en accord avec les lois de l'adsorption. Selon ce dernier, le bioxyde

pourrait ainsi être préférentiellement adsorbé à la surface de la capsid, ce qui favoriserait la présence de concentrations locales de ClO_2 très élevées à la surface du virion.

Dans le cas des spores de *B. subtilis*, les travaux de Young et Setlow (2003) suggèrent que, tout comme dans le cas des virus, l'inactivation n'est pas causée par la destruction du matériel génétique. En fait, le bioxyde de chlore et les hypochlorites oxydèrent le cortex, une constituante essentielle à la bonne germination des spores. Ce résultat est analogue à l'oxydation de la capsid virale, laquelle participe au processus d'infection et est donc une constituante vitale des virus.

À la lumière de ces études, il apparaît logique de conclure que, tout comme le chlore, le bioxyde de chlore intervient simultanément sur plusieurs sites d'action.

2.2.3 Caractéristiques de l'eau influençant l'efficacité du bioxyde de chlore

2.2.3.1 Facteurs influençant l'activité chimique du ClO_2

Il est généralement admis que l'activité bactéricide et virulicide du bioxyde de chlore n'est pas influencé par une hausse du pH. Cette observation est cohérente avec le fait que, pour une gamme de pH de 6.0 à 9.0, le bioxyde de chlore demeure sous la forme d'un radical libre (Gordon et al. 1987). Par ailleurs, plusieurs auteurs (Cronier et al., 1977; Chen et al., 1985 ; Masschelein, 1992; Botzenhart, 1993) ont même observé une meilleure efficacité à pH basique pour l'inactivation de *E. coli*, *L. pneumophila*, les spores de *B. subtilis*, les kystes de *Naegleria gruberi*, les bactériophages f2, poliovirus et certains autres entérovirus. À l'opposé, Junli et al. (1997) ont observé une moins bonne inactivation de six types de virus à pH 11. Ce résultat fut expliqué par le fait que le bioxyde de chlore se dismute à pH basique. L'effet était donc plutôt attribuable à un effet de rémanence et non en tant que tel à une activité réduite du bioxyde de chlore.

Lors de la rédaction de la réglementation américaine (SWTR, 1989), l'EPA avait également reconnu l'effet favorable des pH basiques en se basant sur les données de

Leahy et al. (1985) ayant servies à l'établissement des tables de CT. Cependant, par manque d'informations, l'EPA avait choisi de produire des tables de CT ne tenant pas compte de ce phénomène.

Différentes hypothèses ont été formulées pour expliquer la meilleure performance du ClO_2 à pH élevé (amélioration typique de moins de 50%). Ainsi, une activité désinfectante des chlorites et des chlorates a été avancée par Masschelein (1985). Cette hypothèse a été testée et s'est avérée fausse (Liyanage et al., 1997). La formation de radicaux libres est également une possibilité (OH^\bullet), quoique von Gunten (2004) doute de leur formation par le bioxyde de chlore, mais n'exclut pas pour autant la formation d'autres types de radicaux libres. Leahy (1985) a également proposé un accroissement de la perméabilité des kystes avec une hausse de pH. Cette hypothèse est également avancée par Masschelein (1992). Elle est en effet attrayante, mais pose un problème quant au fait que l'effet de pH semble universellement observé entre plusieurs classes de micro-organisme (parasites, virus et bactéries). Or, la composition des membranes de protection (kyste, capside, paroi cellulaire) est différente d'une classe d'organisme à l'autre.

En fait, il se pourrait que le bioxyde de chlore soit tout simplement plus réactif à pH basique. En effet, selon Hoigné et Bader (1994), la réactivité du ClO_2 vis-à-vis des substances humiques augmente d'un facteur trois pour chaque augmentation d'unité de pH. Cette activité accrue du bioxyde de chlore à pH élevé serait donc cohérente avec l'amélioration de son efficacité comme désinfectant sous ces conditions. D'ailleurs, Ruffell et al. (2000) invoque également cette hypothèse pour expliquer l'efficacité accrue du bioxyde vis-à-vis *Cryptosporidium* à pH basique.

Comme le pH a, somme toute, peu d'effet sur l'efficacité du bioxyde, l'effet de la température est la variable la plus importante pour expliquer les variations d'activité chimique du bioxyde de chlore. Bien que les études à ce sujet soient moins nombreuses que pour le chlore, il est généralement accepté que l'effet de la température sur

l'efficacité du ClO_2 soit du même ordre que pour le chlore, soit un facteur multiplicatif de 2 à 3 pour chaque baisse de 10°C . Cependant, le recensement de données de la littérature scientifique indique plusieurs valeurs inférieures à 2.0 (Tableau 2-3), exception faite des parasites qui semble plus difficile à inactiver en eaux froides. Cette remarque est intéressante puisqu'elle suggère que le mécanisme de réaction limitant du bioxyde de chlore est différent pour cette classe de microorganismes.

Dans le cas de la réglementation américaine de 1989, l'EPA n'a pas appliqué une relation d'Arrhénius pour décrire l'inactivation de *Giardia*. Les données en eaux froides étaient alors limitées à l'étude de Rubin (1985, cité dans USEPA, 1989). Cette étude indiquait des CT de 27.9 mg•min/L à 1°C , 11.8 mg•min/L à 5°C , 8.5 mg•min/L à 15°C et 4.7 mg•min/L à 25°C . Notre analyse de ces données porte à croire que la valeur à 5°C est erronée puisque les trois autres données sont très cohérentes avec une loi d'Arrhénius ($Q_{10}=2.9$). En ce qui concerne la prochaine réglementation américaine (LT2STWR), l'effet de température sur l'inactivation de *Cryptosporidium* sera décrit par une loi d'Arrhénius utilisant un Q_{10} de 2.4.

Enfin, en guise de conclusion sur le rôle de la qualité de l'eau sur l'activité chimique du bioxyde, mentionnons qu'aucune étude ne s'est attardée à évaluer l'impact de la force ionique (contrairement à la chloration).

Tableau 2-3: Comparaison de l'effet de la température sur l'efficacité du bioxyde de chlore pour différents microorganismes

Organismes	Q ₁₀	Références
Parasites		
<i>Giardia</i>	2.9	Rubin, 1998 cité dans USEPA, 1989 – sans T=10°C
<i>Cryptosporidium parvum</i>	2.4	USEPA, 2001
<i>Cryptosporidium parvum</i>	1.7	LeChevallier et al., 1996
<i>Cryptosporidium parvum</i>	≈ 2.0	Finch et Li, 1999
<i>Cryptosporidium parvum</i>	3.4	Ruffell et al., 2000
<i>Naegleria gruberi</i>	1.7	Chen et al., 1985
Bactéries/spores		
<i>E.coli</i>	1.3	Junli et al., 1997
<i>E.coli</i>	1.7	Bernade et al., 1967
<i>E.coli</i>	1.4	Cronier et al., 1977
<i>B. subtilis</i> sp.	2.3	Barbeau et al., 2002
Virus		
<i>Coliphages MS2</i>	2.0	Barbeau et al., 2002
<i>Poliovirus 1</i>	2.2	Cronier et al., 1977
<i>Poliovirus 1</i>	1.7	Junli et al., 1997

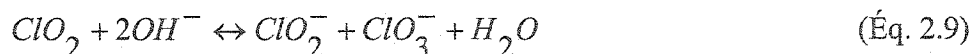
Note: Q₁₀ = Facteur multiplicatif du CT pour une baisse de 10°C.

Calculs basés sur les données publiées.

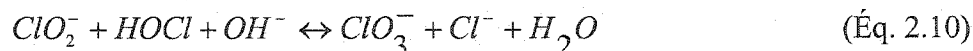
2.2.3.2 Facteurs influençant la persistance du bioxyde de chlore en solution

Similairement au chlore, le bioxyde subit des réactions compétitives qui diminuent la concentration effective disponible pour la désinfection. Dans le cas du bioxyde de chlore, les composés les plus fréquemment responsables de la demande en oxydant incluent : (i) la matière organique naturelle, (ii) le fer et le manganèse et (iii) les sulfures. Dans le cas où l'ajout de bioxyde de chlore vise à éliminer les sulfures, le fer ou du manganèse, sa capacité d'oxydation est alors mise en contribution, typiquement à l'eau brute ou à l'eau décantée. Comme l'objectif n'est alors pas la désinfection, cet aspect ne sera pas traité et on se concentrera plutôt sur le rôle de la matière organique ainsi que des interactions possibles avec les autres oxydants.

L'effet du pH sur le bioxyde de chlore s'apparente à celui de l'ozone, *i.e.* une augmentation du pH viendra compromettre sa stabilité. L'équation 2-9 décrit la réaction en cause, *i.e.* la dismutation du ClO_2 en chlorites et en chlorates :



Selon Aieta et Berg (1986), cette réaction est significative pour des pH élevés (> 9) et totale pour un pH supérieur à 11. Un pH aussi élevé est surtout rencontré lors des traitements d'adoucissement par précipitation. Par ailleurs, il est bon de mentionner que le bioxyde de chlore peut coexister en présence de chlore. Théoriquement, l'acide hypochloreux peut oxyder le bioxyde de chlore en chlorates, mais la cinétique de réaction est tellement lente (15-20 jours) qu'on peut à toute fin pratique négliger cette réaction (Aieta et Berg, 1986). En fait, toujours selon ces auteurs, la réaction la plus significative observée lors de l'injection de bioxyde dans une eau chlorée consiste en l'oxydation lente (et donc partielle) des chlorites en chlorates, tel que décrit par l'équation 2-10.



En ce qui concerne l'ozonation, les chlorites et le bioxyde de chlore seront oxydés en chlorates au cours de ce type de traitement (Long et al., 1999). Il est donc désavantageux d'utiliser le bioxyde de chlore avant une étape d'ozonation compte tenu que l'oxydation des chlorites entraînera une hausse de la dose d'ozone requise pour le traitement.

Hormis le pH, la demande en bioxyde s'accroît avec la température, la concentration de COT et le niveau d'oxydation ($\text{mg ClO}_2/\text{mg COT}$) (Morissette, 1993). D'ailleurs, tel que mentionné précédemment, la réactivité du ClO_2 vis-à-vis des substances humiques augmente d'un facteur trois pour chaque augmentation d'unité de pH (Hoigné et Bader, 1994). Cette activité accrue du bioxyde de chlore à pH élevé est d'ailleurs cohérente avec l'amélioration de son efficacité comme désinfectant sous ces conditions.

Injecté dans des eaux avec une faible demande telles que les eaux filtrées sur charbon actif granulaire, le bioxyde est assez stable (Duchesne et al., 1987). De façon générale, le bioxyde de chlore a d'ailleurs la réputation d'être un oxydant plus persistant que le chlore dans les eaux traitées (Rav-Acha, 1984 ; Werdehoff et al., 1987 ; Aieta et Berg, 1986). Évidemment, l'absence de réactivité du bioxyde de chlore avec l'azote ammoniacal lui confère un avantage important sur le chlore. En pratique, comme les doses de bioxyde sont limitées à environ 1,4 mg/L (en raison de la formation de chlorites/chlorates), son utilisation en tant que désinfectant est surtout limitée à la post-désinfection. Par exemple, Werdehoff et al. (1987) ont observé que des doses de 1 mg/L et 2 mg/L de ClO_2 étaient consommées après deux heures de temps de contact pour des eaux brutes affichant des COT de 2.1 et 5.2 mg/L, respectivement. En comparaison, Morissette et al. (1996) ont mesuré une demande en ClO_2 d'environ 1.25 mg/L après deux heures pour les eaux brutes de l'usine Atwater (Montréal, COT = 2.5 mg/L), un résultat consistant avec les observations de Werdehoff et al. (1987).

En résumé, le bioxyde de chlore offre des avantages intéressants au niveau de sa rémanence, mais cet avantage est difficile à transposer à la pratique en raison de la réglementation imposant une limite sur la formation de chlorites (1.0 mg/L.).

2.2.3.3 Facteurs influençant l'accessibilité du chlore au microorganisme visé

Tout comme le chlore, il est anticipé que la désinfection à l'aide du bioxyde de chlore soit moins efficace si l'organisme est agrégé, occlus à l'intérieur d'un autre ou associé à de la turbidité organique ou inorganique. Cependant, on a recensé très peu d'études scientifiques sur le sujet.

Sproul et al. (1984) ont déterminé que la bentonite avait un impact modeste sur l'inactivation des parasites par le ClO_2 . Les valeurs de CT étaient en effet augmentées d'environ 11% et 25% pour des turbidités de 0 – 5 UTN ou 5 – 17 UTN, respectivement. Narkis et al. (1995) ont également étudié l'interférence des particules

sur la désinfection avec le bioxyde, en utilisant cependant des eaux usées. Leurs travaux démontrent que les microorganismes associés à des matières en suspension (MES) étaient plus résistants à la désinfection. Cependant, la concentration de MES était d'environ 400 mg/L, ce qui rend toute comparaison avec l'eau potable difficile.

Les travaux les plus complets dans le domaine proviennent en fait de l'EPA (Scarpino et al., 1979) qui ont étudié en laboratoire les cinétiques d'inactivation de deux entérovirus (poliovirus 1 -Mahoney- et coxsackievirus A9), et de la bactérie *E. coli*. Les effets de la turbidité inorganique (bentonite), organique (débris cellulaires) et de l'agrégation des virus ont été étudiés durant ce projet. Il a été observé que les débris cellulaires ne protégeait pas poliovirus 1 du bioxyde de chlore, l'agrégation des virus étant un facteur beaucoup plus important. En ce qui concerne la turbidité inorganique, son augmentation réduisait l'efficacité du bioxyde de chlore. Cette observation est à contre-courant des études sur l'effet protecteur de la turbidité inorganique par la chloration et les monochloramines. Néanmoins, Scarpino et al. (1979) concluent que, pour la gamme typique de pH des eaux naturelles, le bioxyde de chlore est un excellent désinfectant comparativement au chlore.

Suite à la présentation des effets de la qualité de l'eau sur l'efficacité du chlore et du bioxyde de chlore, cette revue sera terminée à la prochaine section en présentant les différents modèles d'inactivation permettant d'analyser les résultats des essais d'inactivation.

2.3 MODÉLISATION DE L'INACTIVATION DES MICRO-ORGANISMES

2.3.1 Modèles pour des eaux sans décroissance du désinfectant

Les premiers travaux ayant décrit d'un point de vue mécanistique l'inactivation des micro-organismes sont attribués à Chick (1908) et Watson (1908), dont l'équation 2-11 décrit la relation sous forme intégrée.

$$\ln \frac{N}{N_o} = -k \times C^n \times T \quad (\text{Éq. 2.11})$$

Avec N/N_o : la fraction survivante;
 C : la concentration,
 T : le temps de contact,
 k et n : des paramètres d'ajustement.

Cette relation est omniprésente dans la littérature scientifique et a également été adaptée pour le contrôle réglementaire de la qualité de l'eau potable, surtout en Amérique du Nord. Les travaux de recherche utilisant d'autres types de modèle prennent d'ailleurs généralement le temps de justifier la supériorité de leur modèle par rapport à la loi de Chick-Watson.

Une des principales modifications à la loi de Chick-Watson a été proposée par Hom (1972) et pressentie par Fair (1947). Cette modification consistait à ajouter un paramètre d'ajustement ' m ' à l'exposant du temps de contact afin de tenir compte de l'effet de temps de latence (*shoulder* pour $m > 1$) ou de la réduction progressive de l'efficacité (*tailing effect* pour $m < 1$).

$$\ln \frac{N}{N_o} = -k \times C^n \times T^m \quad (\text{Éq. 2.12})$$

En ce qui concerne, les courbes d'inactivation avec phase de latence, il est également possible de les modéliser avec une relation de Chick-Watson modifiée telle que :

$$\begin{aligned} \ln \frac{N}{N_o} &= -k \times (CT - CT_{lag}) & \text{si } CT \geq CT_{lag} \\ \ln \frac{N}{N_o} &= 0 & \text{si } CT < CT_{lag} \end{aligned} \quad (\text{Éq. 2.13})$$

Cette approche, proposée par Rennecker et al. (2000), offre l'avantage de conserver l'utilisation du modèle de Chick-Watson, lequel est simple et accepté par l'industrie du traitement de l'eau. Il vient également reconnaître que les cinétiques postérieures à la phase de latence sont la plupart du temps adéquatement décrites par le modèle de Chick-Watson. Cependant, ce modèle ne permet pas de décrire les phénomènes de *tailing*.

Par ailleurs, d'autres modèles ont également été proposés au fil des ans basés sur les hypothèses que (i) la concentration initiale d'organismes influence la cinétique (*rationnel, Hom Power law*), (ii) un organisme possède de nombreux sites sensibles lesquels doivent être tous inactivés avant sa mort (*multiple target*) ou (iii) qu'un seul site à l'intérieur de l'organisme doit être touché à de nombreuses reprises (*series-event*).

Le modèle rationnel a été décrit initialement par Majumdar et al. (1973) selon la relation suivante, laquelle est essentiellement identique à celle de Chick-Watson, hormis le fait que la concentration d'organismes (N) soit élevée à la puissance x (un paramètre d'ajustement):

$$\frac{dN}{dt} = -k \times N^x \times C^n \quad (\text{Éq. 2.14})$$

La solution à cette équation différentielle est donnée par l'équation 2-15 :

$$\text{Ln} \frac{N}{N_o} = \left(\frac{-1}{x-1} \right) \times \text{Ln} \left[1 + N_o^{x-1} (x-1) k \times C^n \times T \right] \quad (\text{Éq. 2.15})$$

Ce modèle permet de décrire les phénomènes de latence ou de *tailing* selon si la valeur de x est supérieure ou non à l'unité ($x > 1 = \textit{tailing}$) et se réduit au modèle de Chick-Watson pour $x = 1$. Le lecteur averti aura également remarqué que la solution impose que x soit différent de 1 afin d'éviter une division par zéro. Similairement au modèle de Hom, le modèle rationnel peut être généralisé en ajoutant un paramètre m à l'exposant du temps de contact de l'équation 2-15. Ce type de modèle est cependant très rarement utilisé dans la littérature scientifique.

Le modèle de Selleck et al. (1978) a été développé pour décrire l'inactivation des coliformes par le chlore dans des eaux usées (Éq. 2-16). Ce modèle est capable de décrire des courbes de type *tailing*, lesquelles sont fréquemment rencontrées dans le domaine de la désinfection des eaux usées en raison de la présence d'agrégats bactériens.

$$\text{Log} \frac{N}{N_o} = -n \text{Ln} \left[1 + \frac{CT}{k} \right] \quad (\text{Éq. 2.16})$$

Le modèle à cibles multiples (*multiple target*) est attribué à Harm (1980) suite à ces travaux sur la désinfection UV. Le postulat de ce modèle est que chaque organisme d'une même espèce possède un nombre identique de cibles critiques (n_c), lesquelles doivent toutes être touchées au moins une fois avant d'obtenir l'inactivation du microorganisme (Severin et al., 1983).

$$\text{Ln} \frac{N}{N_o} = \text{Ln} \left[1 - (1 - e^{-kCT})^{n_c} \right] \quad (\text{Éq. 2.17})$$

Ce modèle a été critiqué par Gyöerek et al. (1998) pour le fait qu'il postule que toutes les cibles sont équivalentes et, donc, que les dommages seront distribués aléatoirement entre les cibles, une hypothèse peu plausible.

Enfin, le modèle d'événements en série (*series event*) a été avancé par Severin et al. (1984) afin de décrire les phénomènes de latence. L'inactivation est décrite comme une série successive de dommages causant la mort. Contrairement au modèle précédent, seulement un nombre prédéfini de sites (parmi un nombre infini de sites potentiels) doit être atteint pour obtenir l'inactivation (tel un compte à rebours). Le taux d'inactivation du $p^{\text{ième}}$ site de réaction est donné par:

$$Ln \frac{N}{N_o} - k \cdot CT + Ln \left[\sum_{p=0}^n \frac{(k \cdot CT)^p}{p!} \right] \quad (\text{Éq. 2.18})$$

Ce modèle n'est pas adapté pour décrire les phénomènes de *tailing*. De plus, selon Haas et Kara (1984b), ce modèle sous-entend que les réactions entre le désinfectant et les sites d'action sont toutes du premier ordre, ce qui serait, à leur avis, insatisfaisant pour décrire l'inactivation des microorganismes.

Enfin, Craik et al. (2002) ont proposé de décrire l'inactivation des spores de *B. subtilis* en émettant l'hypothèse d'une population mixte composée de spores agglomérées ($N_{o,a}$) et de spores individuelles ($N_{o,i}$). Ces deux populations possèdent des sensibilités distinctes à la désinfection (k_i et k_a). L'inactivation des spores individuelles est décrite à partir du modèle à cibles multiples de Harm (1980) - voir Éq. 2-17. Ainsi, l'équation 2-19 permet à la fois de décrire des phénomènes de *tailing* et des phénomènes de latence :

$$N = N_{o,i} \times \left[1 - \left(1 - \exp(-k_i \cdot CT) \right)^{n_c} \right] + N_{o,a} \times \exp(-k_a \cdot CT) \quad (\text{Éq. 2.19})$$

où: $N_{o,i}$: Nombre initiale d'organismes libres
 $N_{o,a}$: Nombre initiale d'organismes agglomérés

2.3.2 Modèles avec décroissance du désinfectant

Afin de modéliser des données d'inactivation dans des systèmes en eaux naturelles, il fut de pratique courante pendant plusieurs décennies d'utiliser la concentration moyenne de désinfectant pour décrire la courbe d'inactivation. Par exemple, le groupe de recherche du regretté Dr Finch a longtemps utilisé un modèle de Hom pour lequel la valeur de la concentration du désinfectant utilisée était une moyenne géométrique. Ce modèle était utilisé pour décrire l'inactivation des parasites par l'ozone. Comme ce désinfectant décroît selon une loi exponentielle, l'utilisation d'une moyenne géométrique était plus appropriée.

Le développement de modèles d'inactivation avec une concentration variable de désinfectant constitue un progrès récent dans le domaine de la désinfection. En effet, il a fallu attendre les années quatre-vingt-dix pour observer l'émergence de cette pratique suite à la possibilité de solutionner des systèmes d'équations non linéaires sur des ordinateurs personnels.

Essentiellement, la plupart des modèles présentés précédemment peuvent être modifiés pour prendre en compte la décroissance du désinfectant. Les équations de tous les modèles avec et sans demande en désinfectant sont regroupées au Tableau 2-4. De façon générale, la procédure consiste à (i) supposer un modèle de décroissance, typiquement une relation du premier ordre par rapport à la concentration de désinfectant et (ii) ré-intégrer l'équation différentielle à l'origine du modèle. Cette approche s'avère en pratique plutôt complexe puisque certaines des intégrales obtenues n'ont pas de solutions analytiques, le modèle *Incomplete Gamma Hom* en étant un bon exemple (Éq. 2.20). Ce modèle nécessite l'emploi de la fonction gamma et suppose une décroissance du premier ordre (k^*).

$$\ln \left(\frac{N}{N_o} \right) = \frac{-k \cdot m \cdot C_o^n}{(n \cdot k^*)^m} \cdot \gamma(m, n \cdot k^* \cdot T) \quad (\text{Éq. 2-20})$$

L'emploi d'un modèle avec plusieurs paramètres accroît son pouvoir explicatif. Cependant, il existe toujours le risque que le modèle soit sur-paramétré, c'est-à-dire que certains paramètres soient fortement auto-corrélés. Cette situation est d'autant plus réelle que les courbes d'inactivation incluent typiquement de 6 à 10 observations, alors que certains modèles emploient jusqu'à quatre paramètres... Dans le cas des modèles sans décroissance, Haas et Karra (1984a) concluent, suite à une étude exhaustive du sujet, que le modèle de Chick-Watson est adéquat et que peu d'améliorations sont obtenues avec les modèles alternatifs. En ce qui concerne les systèmes avec décroissance, Gyürék et Finch (1998) recommandent l'utilisation du modèle incomplet gamma de Hom (*Incomplete Gamma Hom* ou IGH) suite à des travaux sur l'inactivation des BHA par ozonation.

Dans ce cas précis, la supériorité de ce modèle provient surtout de sa capacité à décrire le phénomène de *tailing* typique des essais d'inactivation de BHA (en raison de la nature hétérogène de la population). Haas et al. (1995) ont également observé la supériorité du modèle IGH pour décrire l'inactivation en eaux naturelles. Cependant, le modèle de Chick-Watson avec décroissance présentait également des résultats tout à fait convenables.

Le modèle IGH n'est pas toujours adéquat puisqu'il pose l'hypothèse que la décroissance du désinfectant est exponentielle (ordre un), ce qui n'est pas toujours le cas. Ainsi, Barbeau et al. (1999) ont observé que, dans le cas où la décroissance serait décrite par une fonction de puissance ($C = a \times C_o \times t^{-k_1}$), le modèle de Hom devait être modifiée en conséquence, ce qui engendrait un modèle de la forme :

$$\ln \left(\frac{N_t}{N_o} \right) = \frac{-k \cdot m \cdot a^n \cdot C_o^n \cdot t^{m-k_1 \cdot n}}{m - k_1 \cdot n} \quad (\text{Éq. 2.21})$$

Le modèle IGH a également comme désavantage de recourir au modèle de Hom pour décrire les phénomènes de latence et de tailing par l'utilisation du paramètre m en exposant du temps de contact. Cette approche ne repose pas sur des considérations mécanistiques telles que les modèles à cibles multiples ou à événements en série. Pour cette raison, son utilisation nous apparaît moins attrayante.

Plus récemment, Finch et al. (2001) ont procédé à une analyse détaillée des données d'inactivation de *Cryptosporidium* par l'ozonation disponibles dans la littérature. Plusieurs modèles d'ajustement différents furent mis à l'épreuve. Sur 22 essais d'inactivation dans différentes eaux naturelles, seules deux conditions étaient mieux décrites par une loi autre que celle de Chick-Watson avec décroissance (Hom ou Hom *power law*, respectivement). D'ailleurs, dans 13 cas, une loi de Chick-Watson avec $n = 1$ (modèle le plus simple) était suffisante pour décrire l'inactivation.

En conclusion, on retiendra les éléments suivants :

- en absence de décroissance, le modèle de Chick-Watson est généralement adéquat pour décrire l'inactivation, mis à part les phénomènes de latence/*tailing* ;
- en présence de décroissance, les modèles de Chick-Watson modifié ou IGH (si latence/*tailing*) peuvent tous deux décrire adéquatement l'inactivation en autant que la décomposition du désinfectant obéit à une relation d'ordre un ;
- les phénomènes de latence peuvent également être décrits par une fonction par morceaux, évitant ainsi de recourir à la loi de Hom.
- les phénomènes de *tailing* peuvent aussi être décrits par un modèle mixte où la population microbienne est hétérogène avec une fraction agglomérée et une fraction libre, nous évitant encore une fois de recourir à la loi de Hom.

La prochaine section présentera les objectifs du projet de recherche qui sont proposés afin de combler certaines lacunes mises à jour par cette revue de la littérature.

Tableau 2-4: Synthèse des modèles de désinfection répertoriés dans la littérature

Modèles sans décroissance du désinfectant	Modèles avec décroissance du désinfectant ($k^*=1^{\text{er}}$ ordre)
<p>Chick-Watson: $-k \cdot C^n \cdot T$</p> <p>Hom: $-k \cdot C^n \cdot T^m$</p> <p>Rationnel ou Hom Power Law (selon la valeur de m)</p> $\left(\frac{-1}{x-1} \right) \cdot \ln \left[1 + N_o^{x-1} (x-1) k \cdot C^n T^m \right]$ <p>Si $m=1$, alors: modèle rationnel</p> <p>Cibles multiples (<i>Multiple-target</i>):</p> $\ln \left[1 - (1 - e^{-(k \cdot CT)^p})^n \right]$ <p>Selleck:</p> $-n \ln \left[1 + \frac{CT}{k} \right]$ <p>Événements en série (<i>Series-event</i>):</p> $-k \cdot CT + \ln \left[\sum_{p=0}^n \frac{(k \cdot CT)^p}{p!} \right]$	<p>Chick-Watson: $-\frac{k}{k^* \cdot n} (C_o^n - C_f^n)$</p> <p>$C_{\text{avg}}$ Hom: $-k \cdot C_{\text{avg}}^n T^m$</p> <p>Rationnel:</p> $\ln \left[1 + (1-x) \cdot \frac{k}{k^* \cdot n} (C^n - C_o^n) \cdot N_o^{x-1} \right]$ <p>Hom Power Law:</p> $\ln \left[1 + (1-x) \cdot \frac{km}{(k^* \cdot n)^m} C_o^n \cdot \gamma (n \cdot k^* T, m) N_o^{x-1} \right]$ <p>Incomplete Gamma Hom (IgH):</p> $\frac{-k \cdot m \cdot C_o^n}{(n \cdot k^*)^m} \cdot \gamma (m, n \cdot k^* \cdot T)$ <p>Selleck:</p> $-n \ln \left[1 + \frac{C_o}{k \cdot k^*} (1 - e^{-k^* T}) \right]$ <p>Hom avec décroissance selon une fonction de puissance:</p> $\frac{-k \cdot m \cdot a^n \cdot C_o \cdot t^{m-k^* \cdot n}}{m - k^* \cdot n}$

Adapté de Finch et al. (2001) Toutes les équations décrivent : $\ln(N/N_o) = f(\text{paramètres}, C, T)$

CHAPITRE 3

OBJECTIFS DE RECHERCHE ET DÉMARCHE EXPÉRIMENTALE

3.1 CRITIQUES DES TRAVAUX ANTÉRIEURS DANS LE DOMAINE

La revue de littérature a permis de démontrer que, malgré l'abondance de travaux portant sur la désinfection, relativement peu de travaux de recherche se sont attardés à l'étude de la désinfection en utilisant des eaux naturelles. En effet, la vaste majorité des travaux dans les années soixante-dix ont plutôt retenu comme approche d'utiliser des eaux reconstituées (en dopant de la turbidité organique et inorganique). Cette approche n'était pas mauvaise en soi puisqu'elle permettait aux chercheurs (i) des comparaisons directes avec leurs résultats antérieurs en eaux sans demande en oxydant et (ii) d'améliorer la reproductibilité des résultats.

Il a fallu attendre les années quatre-vingt-dix pour que des chercheurs évaluent rigoureusement les effets de la désinfection en eaux naturelles (Haas et al., 1995; Oppenheimer et al., 1999). Dans les deux cas, il fut observé que la désinfection en eaux naturelles était moins efficace qu'en eaux ultra-pures tamponnées, sans pouvoir cependant mettre à jour le(s) paramètre(s) en jeu. Ces études consistent des références dans ce domaine d'étude en raison de l'utilisation de modèles de désinfection tenant compte de la décroissance du désinfectant. Les différences de performance ne peuvent donc être attribuées à différents taux de décroissance du désinfectant.

On estime cependant que les études antérieures sur l'efficacité de la désinfection présentent les faiblesses suivantes :

1. la majorité des travaux ont été réalisés en eaux tamponnées sans demande en désinfectant,

2. les travaux en eaux synthétiques avec ajout de turbidité de diverses origines sont faibles au niveau de la modélisation cinétique des inactivations,
3. l'essentiel des travaux en eaux naturelles n'a pas distingué adéquatement l'effet de la matrice de l'eau de la simple consommation accrue de désinfectant,
4. les rares travaux en eaux naturelles utilisant une modélisation appropriée n'ont pas évalué la reproductibilité de leurs résultats. Les essais sont réalisés sur un court laps de temps en faisant varier les variables une à la fois. Cette façon de faire ne garantit pas une évaluation adéquate de l'erreur expérimentale. La façon adéquate de procéder requiert de recommencer entièrement l'essai plusieurs semaines plus tard idéalement. De plus, les interactions entre différentes variables n'ont pas été étudiées.

3.2 OBJECTIFS

L'objectif général de ce projet de recherche consiste à étudier la désinfection en eaux naturelles d'organismes résistants à la désinfection afin de mettre à jour les phénomènes à l'origine de la réduction de performance en eaux naturelles, tout en évitant les faiblesses mentionnées précédemment. Plus spécifiquement, ce projet visera à :

1. comparer l'effet du pH, de la température, de la matière organique et de la turbidité sur l'efficacité du chlore et du bioxyde de chlore,
2. mettre à jour les interactions (synergies/antagonismes) existant entre ces différentes variables,
3. étudier les phénomènes d'agrégation microbienne et évaluer les caractéristiques des eaux favorisant son apparition,
4. comparer des résultats d'essais en eaux naturelles avec des résultats d'essais en eaux synthétiques,
5. comparer l'efficacité relative du bioxyde de chlore et du chlore.

L'atteinte de ces objectifs devrait permettre en fin de compte de conclure sur les aspects suivants :

- De l'activité chimique du désinfectant, de sa rémanence en solution ou de l'accessibilité aux microorganismes, quel est le phénomène le plus important pour expliquer l'efficacité de la désinfection ?
- Quels sont les facteurs de sécurité à prévoir pour la désinfection en eaux naturelles ?
- Est-ce que l'utilisation de modèle tel que l'*Integrated Disinfection Design Framework* (IDDF) est justifiée (lequel permet de réduire les facteurs de sécurité lors de l'opération des contacteurs grâce à une meilleure modélisation des phénomènes hydrauliques et de décroissance du désinfectant) ?

La réalisation de ce projet de recherche est supportée par les hypothèses de recherche suivantes :

1. Le CT effectif (l'aire sous la courbe de décroissance) décrit adéquatement la dose effective reçue par les microorganismes,

Cette hypothèse peut être démontrée en prouvant que l'utilisation de modèles de désinfection autre que le modèle de Chick-Watson basé sur le CT effectif n'apporte pas d'amélioration statistiquement significative à la description des données.

2. Les interactions entre diverses variables de qualité sont significatives, de telle sorte qu'il est inadéquat d'extrapoler un effet donné à d'autres conditions (par exemple, l'effet du pH à 1°C n'est peut-être pas le même qu'à 22°C),

Cette hypothèse peut être démontrée en prouvant que les interactions (pH × température, par exemple) sont statistiquement significatives lors de l'analyse de variance (ANOVA).

3. Mis à part son rôle défavorable sur la consommation du désinfectant, la matière organique naturelle a un effet significatif sur l'efficacité de la désinfection,

Cette hypothèse peut être prouvée en comparant les cinétiques d'inactivation de divers microorganismes dans des eaux synthétiques reconstituées avec ou sans matière organique naturelle.

4. L'agrégation des microorganismes est un paramètre plus important vis-à-vis de l'efficacité de la désinfection que la présence de particules inorganiques,

Cette hypothèse peut être démontrée en comparant les effets de la turbidité sur l'efficacité de la désinfection par rapport à l'accroissement de résistance fournie par l'agrégation des microorganismes entre eux.

3.3 MISE EN ŒUVRE

La réalisation du présent projet de recherche s'appuie sur une démarche expérimentale en deux volets.

1. Étude de tamisage des variables d'intérêt par un design statistique fractionnaire

En raison du nombre important de variables influençant l'efficacité de la désinfection, nous avons réalisé une première étape où les principales variables d'intérêt (le pH, la turbidité, la matière organique naturelle et la température) furent étudiées par un design statistique fractionnaire ($2^{(4-1)} = 2^3 = 8$ types d'eaux en triplicatas). Les eaux étudiées sont des eaux reconstituées (eaux tamponnées avec ajout de kaolin et/ou d'extrait de matière organique naturelle). Cette approche permet (i) de réduire le nombre d'essais d'au moins 50%, (ii) d'identifier les interactions entre les variables, (iii) de fournir des essais reproductibles d'un point de vue scientifique et (iv) de comparer le poids relatif de chacune des variables dans sa capacité à interférer avec l'efficacité du bioxyde de chlore et du chlore libre. Le détail du plan expérimental sera explicité à la prochaine section.

2. Comparaison avec des essais en eaux naturelles

Dans une deuxième étape, on utilise des eaux naturelles afin de reproduire une fraction des essais réalisés lors de la première phase. L'originalité de cette approche repose sur le fait que trois types de comparaison seront alors possibles : désinfection dans des eaux tamponnées ultra-pures (données de la phase I), des eaux tamponnées ultra-pures dopées en en turbidité et COT (données de la phase I) et finalement des eaux naturelles (données de la phase II). Le détail de la planification des essais est présenté à la prochaine section.

3.3.1 *Essais en eaux reconstituées*

Cette première phase est importante puisqu'elle permet d'assurer un contrôle des variables à l'étude ainsi que des comparaisons directes avec des études antérieures dans le domaine.

3.3.1.1 Désinfectants à l'étude

Tel que discuté précédemment, il a été décidé de restreindre le travail à l'étude du bioxyde de chlore et du chlore.

3.3.1.2 Microorganismes

La revue de littérature supporte le fait que l'impact des caractéristiques de l'eau sur la désinfection n'est pas indépendant du microorganisme visé. Cet état de fait complique grandement l'étude de la désinfection. Par ailleurs, le choix du microorganisme à étudier est également limité par les coûts d'analyse et le nombre d'analyses pouvant être effectuées dans un laps de temps raisonnable. Pour ces raisons, deux microorganismes cibles seront étudiés: les spores de *B. subtilis* et les coliphages MS2.

Spores de *Bacillus subtilis*: La détection de *Giardia lamblia* et *Cryptosporidium parvum*, les pathogènes les plus résistants, est coûteuse, techniquement complexe et

produit des résultats souvent variables d'un laboratoire à l'autre (Clancy et al., 1996). Plusieurs auteurs (Rice et al., 1994; Kawamura et al., 1986; Toenniessen et Johnson, 1970; Rice et al., 1996; Barbeau et al., 1998) ont proposé d'utiliser les spores comme indicateur de la performance du traitement. Ces spores sont environ aussi sinon plus résistantes que les kystes de *Giardia* (Barbeau et al., 1997). Récemment, une étude sur la recherche de l'indicateur idéal a conclu que, même si cet indicateur n'existait pas, l'utilisation des spores aérobies offrait plusieurs avantages intéressants (Nieminski et Bellamy, 1998).

Les spores de la souche de référence ATTC 6633 (0453-52-9, Difco) seront utilisées durant ce projet. Elles seront détectées selon la méthode proposée par Barbeau et al. (1997), laquelle repose sur une pasteurisation directe des boîtes de Pétri pendant 15 minutes dans un bain-marie à 75°C suivie d'une incubation pendant 24 h à 35°C. La pasteurisation permet d'éliminer la fraction non sporulée des bactéries hétérotrophes tout en induisant la germination de la fraction sporulée.

Coliphages MS2: Les bactériophages MS-2 (ATCC # 15597B) sont préparés en inoculant son hôte *E. coli* (ATCC # 15597). Ce virus est utilisé très fréquemment en raison de ses caractéristiques (taille, point isoélectrique, forme) qui s'approchent de celles d'autres virus entériques. De plus, il est très facile à énumérer et la reproductibilité analytique est excellente. L'énumération des bactériophages est faite par la technique de l'agar à double couche (USEPA, 2001). La bactérie hôte est cultivée dans un bouillon de TSB et ajoutée au stock de virus dilué dans de l'agar. Ce mélange est alors étendu sur une autre couche d'agar et incubé à 37°C pendant 24 heures. Les plaques de lyse sont énumérées, similairement aux comptes de colonies bactériennes. Les résultats sont exprimés en UFP/mL. Des contrôles négatifs et positifs consistent à énumérer 1.5 mL de la solution-mère de *E. coli* diluée dans de l'eau stérile tamponnée ou une dilution de la solution-mère de MS2, respectivement.

3.3.1.3 Montage expérimental

Les essais de désinfection sont réalisés dans des réacteurs parfaitement mélangés. Ces réacteurs sont en fait des bouteilles en verre ambré de 1 L incluant un barreau magnétique. La procédure expérimentale consiste à préparer les eaux reconstituées 24 heures avant l'essai et les ensemercer avec les microorganismes. Le mélange est agité à 60 rpm à la température de la pièce afin de promouvoir des interactions organismes-particules-matière organique (s'il y a lieu). Ce protocole a déjà été utilisé dans le passé par Morin et al. (1996) et Gauthier et al. (1999).

L'essai de désinfection consiste à injecter au temps 0 une concentration C_a de désinfectant et puis de prélever en fonction du temps des échantillons microbiologiques (environ 10) et des échantillons pour mesurer la décroissance du désinfectant (5 à 10). Les essais avec les spores durent de 2 à 12 heures en raison de leur grande résistance, alors qu'un essai avec les coliphages MS2 est complété en moins de 5 minutes. Un réacteur témoin est également utilisé afin de s'assurer de la survie des microorganismes en absence de tout désinfectant.

3.3.1.4 Plan expérimental

Tel que discuté précédemment, l'approche retenue utilise des plans statistiques fractionnaires afin de réduire le nombre d'essais et d'accroître la robustesse de notre démonstration. À cette fin, un logiciel commercial (Statistica, Statsoft, 1998) est utilisé pour établir le design expérimental optimal en utilisant la technique proposée par Box et al. (1978). Cette approche identifie l'influence des variables de contrôle (pH, température, turbidité, carbone organique dissous (COD)) sur la variable de réponse (le CT 2 log, par exemple) par une analyse de variance (ANOVA). Pour chacune des quatre variables et trois interactions confondues (pH x température, par exemple), un modèle mathématique (Éq. 3-1) calcule leur importance pour expliquer la variable de réponse, ce qui est équivalent à une analyse de sensibilité.

$$Y(output) = \beta_0 + \sum_{j=1}^4 \beta_j x_j + \sum_{k=1}^3 \beta_k x_k + error \quad (\text{Éq. 3-1})$$

Ce modèle explique donc les variations de la variable de réponse Y par les variables de contrôle (x). Les variables x_k représentent les interactions de deuxième ordre des variables de contrôle $x_j \cdot x_j$, (j·j'). Les coefficients β sont calculés par Statistica à partir des résultats accumulés durant les essais en minimisant la somme des carrés des résidus. Pour chacune des variables (et interactions), le pourcentage d'explication de la variabilité de Y peut être calculé en utilisant la décomposition de la variance (ANOVA) pour le modèle décrit par l'équation 3.2. Par conséquent, pour une variable de contrôle x_1 (le pH, par exemple), nous avons :

$$x_1(\%) = \frac{SSR(x_1|x_2...x_n)}{SSTO} = \frac{SSR(x_1|x_2...x_n)}{\sum_{i=1}^n (Y_i - \bar{Y})^2} \quad (\text{Éq. 3-2})$$

Où $SSR(x_1 | x_2...x_n)$ est la variance du modèle expliquée par x_1
 $SSTO$ est la variance totale de l'espace expérimentale pour n observations de Y_i
 \bar{Y} est la grande moyenne des n observations de Y_i

Le plan d'expérience utilisé est basé sur un plan factoriel fractionnaire à 4 variables étudiées à deux niveaux (min-max) et est présenté aux tableaux 3.1 et 3.2. Théoriquement, le nombre d'essais requis serait de $2^4 = 16$ pour un plan factoriel complet. Dans le cas présent, la technique de Box et al. (1978) permet de réduire de moitié en utilisant un plan de $2^{(4-1)} = 2^3 = 8$ essais. Un neuvième essai est ajouté à mi-distance de chacune des variables afin d'évaluer la linéarité des variables à l'intérieur du domaine expérimental. Ce plan factoriel sera répliqué pour chacun des microorganismes à l'étude (2) et chacun des désinfectants (2), ce qui générera donc 4 matrices à analyser. De plus, chacune des neuf conditions d'eau sera répliquée à trois reprises afin d'évaluer l'erreur expérimentale. Donc, au total, il faudra prévoir 9 conditions x 3 réplifications x 2 désinfectants x 2 microorganismes = 108 réacteurs, soit environ 4000 analyses microbiologiques.

Tableau 3-1 : Description du plan expérimental retenu pour la phase I du projet

Désinfectants	ClO ₂		Cl ₂	
Organismes	MS2	Spores	MS2	Spores
Types d'eau (voir tableau 3.2)	9 conditions d'eaux triplicatas	9 conditions d'eaux triplicatas	9 conditions d'eaux triplicatas	9 conditions d'eaux triplicatas
Nombre total de réacteurs	27	27	27	27
Nombre d'observations ¹	270	270	270	270

1 : Environ 10 analyses microbiologiques sont effectuées sur chaque réacteur.

Tableau 3-2: Description du plan statistique (identique pour les 4 combinaisons du tableau 3-1)

Condition #	pH	Température (°C)	Turbidité (UTN)	COD (mg C/L)
1	6.5	7	<0.2	0.1
2	8.5	7	<0.2	5
3	6.5	22	<0.2	5
4	8.5	22	<0.2	0.1
5	6.5	7	5	5
6	8.5	7	5	0.1
7	6.5	22	5	0.1
8	8.5	22	5	5
9 (Centrée)	7.5	14.5	2.6	2.55

Des réacteurs témoins sont également prévus durant la réalisation. Ces témoins consistent à évaluer la survie dans le temps des microorganismes en absence de tout désinfectant afin de s'assurer que l'inactivation observée dans les autres réacteurs est belle et bien attribuable à l'action des désinfectants. D'autre part, dans le cas des coliphages MS2, certaines des analyses furent réalisées à l'*University of South Florida*. Lors de l'envoi par courrier rapide, un aliquote de la solution-mère de coliphages MS2

était ajouté comme témoin de transport (*transport blank*) afin de démontrer l'absence d'impacts liés au transport.

3.3.1.5 Caractéristiques des eaux étudiées

Les eaux synthétiques sont produites à partir d'eaux ultra-pures (Milli-Q) tamponnées ($\mu=0.01$ M) et additionnées, au besoin, de kaolin (Hydrite-D, Phipps&Birds) pour simuler la turbidité. Selon un essai de tamisage, le diamètre moyen (D_{50}) des particules de ce kaolin est de 5 μm . Il a été confirmé expérimentalement que plus de 90% des particules supérieures à 2 μm détectées par un compteur de particules (Hach, WPC1900) sont dans la gamme de 2 à 5 μm .

Un tampon phosphate est utilisé pour le pH de 6.5 alors qu'un tampon borate est utilisé pour le pH de 8.5. Cette distinction provient du fait que la capacité tampon des sels de phosphate est insuffisante à pH 8.5 (puisque le pK_a est de l'ordre de 8.3).

Lorsque nécessaire, de la matière organique naturelle (MON) est ajoutée sous la forme d'extrait de la rivière Suwannee. Cette matière organique provient de l'*International Humic Substances Society (IHSS)* qui met à la disposition des chercheurs un lot ayant été extrait par osmose inverse et puis lyophilisé. Cette matière organique a été choisie du fait qu'elle est une des matières organiques les plus étudiées dans la communauté scientifique en raison de sa disponibilité et de sa normalisation par l'IHSS. Cette situation fait en sorte qu'elle est très bien caractérisée. Ainsi, sa composition élémentaire est: 48.8 % C; 3.9 % H; 39.7 % O; 1.02 % N; 0.60 % S; 0.02 % P; 7.0 % Cendres. Son aromaticité (SUVA) est de 4.3 L mg^{-1} m^{-1} . Une solution-mère (100 mg C/L) est préparée à l'aide d'eau Milli-Q, filtrée sur 0.22 μm et puis stockée à 4°C en absence de lumière.

Tel que discuté précédemment, les eaux synthétiques sont préparées la veille des essais de désinfection. Une fois préparées, ces eaux sont placées sur une plaque

agitatrice à 60 rpm pour une période de 24 heures. La température est ajustée dans un bain-marie à température contrôlée.

3.3.1.6 Préparation et analyse des désinfectants

Une solution-mère de chlore est préparée à une concentration de 15 g/L en diluant de l'eau de Javel (5,5%) dans de l'eau Milli-Q. La journée de l'essai, une solution-fille est préparée pour avoir une concentration finale d'environ 150 mg/L. L'analyse du chlore libre est faite selon la méthode colorimétrique à la DPD (*Standard Methods*, 1998) en utilisant des cellules de 5.0 cm lorsque la concentration anticipée est inférieure à 0.3 mg/L.

La mesure du bioxyde est faite grâce à la méthode à l'ACVK, laquelle est basée sur une décoloration de l'Acide Chrome Violet K telle que décrite par Masschelein et al. (1989). Cette décoloration est mesurée par spectrophotométrie à 548 nm en utilisant des cellules de 5.0 cm. Un blanc est préparé par ajout dans l'échantillon de sulfite de sodium (0.25 mL d'une solution à 200 mg/L).

Le bioxyde de chlore est préparé selon la procédure décrite dans *Standard Methods* (2500-ClO₂). Le bioxyde de chlore est produit grâce à la réaction d'une solution concentrée de chlorite de sodium (56 g/L) avec de l'acide sulfurique (50%). Le bioxyde de chlore est récupéré par stripping à l'aide d'un courant d'azote gazeux qui est alors mis en contact successivement avec une solution concentrée de chlorite de sodium (550 g/L et, par la suite, avec de l'eau Milli-Q. La concentration de la solution-mère produite avoisine 1000 mg ClO₂/L et a un pH d'environ 4. Stockée à 4°C en absence de col d'air, cette concentration est demeurée stable pendant plusieurs mois.

3.3.2 Modélisation des essais d'inactivation

La modélisation des essais d'inactivation est réalisée à l'aide du modèle de Chick-Watson, modifié pour tenir compte de la décroissance du désinfectant. En présence de phase de latence, une équation par parties est employée (Éq. 3.3).

$$\begin{aligned} \ln \frac{N}{N_0} &= -k \times (CT - CT_{lag}) & \text{si } CT \geq CT_{lag} \\ \ln \frac{N}{N_0} &= 0 & \text{si } CT < CT_{lag} \end{aligned} \quad (\text{Éq. 3.3})$$

L'avantage de cette approche repose sur sa flexibilité en terme de description du modèle de décroissance. En effet, plutôt que de supposer *a priori* un modèle de décroissance, le CT est calculé comme étant l'aire sous la courbe de décroissance au temps t (Éq. 3.4).

$$CT_{\text{effectif}} = \int_0^t C(t) \cdot dt \quad (\text{Éq. 3.4})$$

où $C(t)$ est une fonction décrivant la décroissance du chlore.

En général, une fonction de puissance ou une décroissance exponentielle étaient les meilleurs modèles pour décrire la décroissance du bioxyde de chlore ou du chlore libre.

Cette stratégie est suffisamment simple pour faciliter la communication et l'application pratique des résultats de cette recherche et assez souple pour décrire adéquatement l'inactivation en eaux naturelles. La seule limite de cette approche est liée à son incapacité de décrire le phénomène de *tailing*. Afin de décrire ce phénomène, un modèle de Chick-Watson parallèle est utilisé, tel que décrit par l'équation 3-5 :

$$\text{Log} \left(\frac{N}{N_0} \right) = \text{Log} \left[(1-r) \cdot e^{(-K_s \cdot CT_{\text{effective}})} + r \cdot e^{(-K_a \cdot CT_{\text{effective}})} \right] \quad (\text{Éq. 3.5})$$

Avec N/N_0 la fraction survivante d'organismes

$CT_{\text{effective}}$ = le CT effectif

r = la fraction de la population sous forme d'agrégats, $0 \leq r \leq 1$

K_a = le taux d'inactivation des organismes sous forme d'agrégats

K_s = le taux d'inactivation des organismes individuels

Ce modèle suppose l'inactivation en parallèle de deux sous-populations de micro-organismes, une première mono-dispersée (K_s) et une deuxième agglomérée (K_a). Le

paramètre r (également obtenu par régression non-linéaire) permet d'attribuer la fraction mono-dispersée et la fraction agglomérée. Il est à noter que nous n'avons jamais eu besoin de modéliser à la fois des phénomènes de *tailing* et de latence.

3.4 ESSAIS EN EAUX NATURELLES

Les essais de désinfection en eaux naturelles utilisent également les spores de *B. subtilis*. Des eaux de surface en provenance de quatre villes du Canada (Montréal) ou des États-Unis (Atlanta, San Juan, et Grand Rapids) furent utilisées. L'eau a été acheminée par messagerie rapide (24h). Les essais de désinfection furent complétés dans les sept jours suivant la réception des eaux, lesquelles furent stockées à 4°C avant leur utilisation. Il fut volontairement décidé d'utiliser des eaux brutes (non traitées) afin d'accroître nos chances d'observer des effets significatifs liés à la turbidité ou à la matière organique.

3.4.1 Caractérisation initiale des eaux étudiées

Avant de débiter les essais, ces eaux furent caractérisées pour les paramètres suivants : pH, température, turbidité, ammoniacale, alcalinité, dureté, COD, absorbance UV et concentration de spores aérobies indigènes. Les caractéristiques des eaux étudiées sont présentées au tableau 3.3.

Au niveau de la minéralisation (alcalinité, dureté, etc.), les eaux de San Juan se distinguent par une plus faible minéralisation. Les eaux de Clayton County étaient par ailleurs beaucoup plus colorées, ce qui se traduisait également par le COD le plus élevé. À San Juan, malgré un COD d'environ 4.0 mg C/L, la couleur était faible soit moins de 5 UCV. Ce constat suggère la présence dominante de substances fulviques (par opposition à humiques), ce qui est d'ailleurs confirmé par la valeur de SUVA relativement faible (2.7). Les eaux de Montréal et Grand Rapids présentaient toutes deux une faible coloration, un faible COD et un faible SUVA.

Pour toutes les eaux, la turbidité peut être considérée faible, soit moins de 5 UTN. Cette caractéristique était désirable puisqu'une turbidité supérieure à 5 UTN excède la plupart des recommandations sanitaires sur la consommation des eaux potables. La démonstration de l'effet de la turbidité pour des eaux dont la turbidité est supérieure à 5 UTN aurait donc peu d'applications pratiques puisque ces eaux ne pourraient pas de toute façon être distribuées sans un traitement de filtration préalable.

Tableau 3- 3: Caractéristiques des eaux naturelles utilisées¹

	Montreal, QC	San Juan, PR	Grand Rapids, MI	Clayton County, GA
Alcalinité (mg/L CaCO ₃)	85	112	116	36
Dureté totale (mg/L CaCO ₃)	86	106	140	32
Dureté calcique (mg/L CaCO ₃)	82	84	86	24
Couleur vraie (UCV)	2	4	< 1	41
Turbidité (NTU)	2.7	2.7	1.0	1.6
COD (mg C/L)	2.66	4.02	1.96	4.54
Ammoniaque (µg/L)	67	88	< 3	32
SUVA (m ⁻¹ mg ⁻¹ L)	2.1	3.0	1.6	5.9
Absorbance UV (cm ⁻¹)	0.057	0.121	0.031	0.27
pH	7.6 – 8.0	7.5 – 7.6	7.6 – 7.9	7.1 – 7.3

1: caractéristiques mesurées sur réception des eaux par messagerie rapide

3.4.2 Description du plan expérimental

La stratégie d'essai pour les eaux naturelles n'utilise pas de plan statistique. On a plutôt retenu un plan d'essai traditionnel avec cinq traitements qui sont étudiées pour

les quatre types d'eau, les deux désinfectants, le tout en duplicata (80 réacteurs au total, soit plus de 800 observations). Ce plan est présenté au tableau 3-4.

La condition 1 est en fait la condition de référence (eau tamponnée à un pH de 6.5 sans demande en oxydant). Ces résultats proviennent de la phase I.

La condition 2 consiste à effectuer des essais de désinfection après dopage de spores (ou de virus) dans les eaux naturelles tamponnées à un pH de 6.5. La comparaison 1-2 permet d'évaluer l'effet 'eau naturelle' sans permettre cependant de distinguer l'effet de la MON ou de la turbidité.

La condition 3 utilise les eaux de surface filtrées et tamponnées à 6.5, ce qui permet donc (par comparaison avec la condition 2) de mesurer le rôle de la turbidité sur la désinfection en eaux naturelles. Le filtre utilisé est un filtre 0.45 μm , ce qui permet d'éliminer les particules en suspension mais de conserver la matière organique dissoute.

La condition 4 utilise les eaux naturelles non tamponnées et permet donc d'évaluer l'effet du pH en eaux naturelles afin de comparer s'il est similaire à l'effet en eaux synthétiques (en comparant 1 vs 4).

Enfin, la condition 5 n'utilise aucun microorganisme cultivé en laboratoire, mais plutôt la population de spores aérobies naturellement présentes dans les eaux de surface. Il sera alors possible de comparer les cinétiques observées pour les populations naturelles avec celles des spores de *B. subtilis* (ATCC 6033).

Les caractéristiques physico-chimiques des eaux traitées, telles que mesurées avant le début des essais de désinfection ainsi que les conditions d'oxydation utilisées lors de ces mêmes essais sont synthétisées aux tableaux 3.5 et 3.6.

Tableau 3-4: Plan d'essai en eaux naturelles (répété pour les 4 eaux naturelles et les 2 désinfectants)

No.	Objectifs	Types d'eaux	Souche bactérienne	pH
#1	Condition de référence	Eau ultra-pure tamponnée	<i>B. subtilis</i> spores	Tamponné à 6.5
#2	Effet de la matrice	Eau brute	<i>B. subtilis</i> spores	Tamponné à 6.5
#3	Impact de la turbidité	Eau brute après filtration sur 0.45 µm	<i>B. subtilis</i> spores	Ambiant
#4	Effet du pH & du tampon	Eau brute	<i>B. subtilis</i> spores	Tamponné à 6.5
#5	Impact de la souche bactérienne	Eau brute	Spores aérobies indigènes	Tamponné à 6.5

Note: Tous les essais sont réalisés à 21-22°C

Les résultats des essais en eaux synthétiques utilisant le chlore et le bioxyde de chlore seront présentés aux chapitres 4 et 5, respectivement. Les résultats des essais en eaux naturelles font l'objet du chapitre 6.

Tableau 3-5: Conditions d'essais de désinfection et caractéristiques des eaux mesurées sur les réacteurs d'essais des eaux de Montréal et San Juan (N.D.: non disponible).

ATWATER – Cl ₂				ATWATER – ClO ₂				PUERTO-RICO – Cl ₂				PUERTO-RICO – ClO ₂				
Dose (ppm)	DOC	Turb. (NTU)	pH	Dose (ppm)	DOC	Turb. (NTU)	pH	Dose (ppm)	DOC	Turb. (NTU)	pH	Dose (ppm)	DOC	Turb. (NTU)	pH	
Condition #1: (Référence)																
Condition #2: (Effets de matrice)																
Réplicat A	2.1	2.62	3.20	6.57	1.4	2.70	2.20	6.91	2.3	4.02	3.10	6.52	3.6	4.01	2.30	6.55
Réplicat B	6.6	2.70	1.95	6.50	4.5	2.67	1.55	6.53	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Condition #3: (Impact du tampon)																
Réplicat A	0.69	2.78	3.30	8.01	1.5	2.96	3.10	7.73	2.3	4.18	3.30	7.56	3.6	4.20	3.60	7.50
Réplicat B	4.2	2.76	1.34	7.63	6.5	2.65	1.21	7.66	9.2	3.52	3.30	7.58	11.2	3.86	3.00	7.61
Condition #4: (Effets de turbidité)																
Réplicat A	3.1	2.96	0.30	6.64	1.6	3.08	0.24	6.90	2.4	3.84	0.35	6.50	3.6	3.73	0.16	6.48
Réplicat B	4.3	2.85	0.31	6.53	3.5	2.77	0.25	6.46	6.5	4.04	0.31	6.49	7.9	3.64	0.38	6.51
Condition #5: (Organisme-cible)																
Réplicat A	0.59	2.58	2.60	6.99	0.89	2.69	2.30	5.98	2.2	nd	2.60	6.62	1.9	3.92	2.00	6.58
Réplicat B	0.23	2.62	1.50	6.57	0.17	nd	1.45	6.60	4.7	3.85	2.60	6.59	7.7	3.85	3.40	6.47

Tableau 3-6: Conditions d'essais de désinfection et caractéristiques des eaux mesurées sur les réacteurs d'essai des eaux de Grand Rapids (Michigan) et Clayton County (N.D.: non disponible).

MICHIGAN – Cl ₂				MICHIGAN – ClO ₂				CLAYTON – Cl ₂				CLAYTON – ClO ₂				
Dose (ppm)	DOC	Turb. (NTU)	pH	Dose (ppm)	DOC	Turb. (NTU)	pH	Dose (ppm)	DOC	Turb. (NTU)	pH	Dose (ppm)	DOC	Turb. (NTU)	pH	
Condition #1: (Référence)																
Condition #2: (Water matrix effects)																
Réplicat A	2.4	1.95	1.14	6.50	2.4	1.96	0.78	6.58	2.7	4.59	1.33	6.52	2.1	4.50	1.90	6.51
Réplicat B	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Condition #3: (Impact du tampon)																
Réplicat A	3.3	2.26	0.59	7.89	1.5	2.05	0.53	7.64	2.0	5.20	1.78	7.18	2.0	4.71	2.30	7.25
Réplicat B	6.2	1.97	0.91	7.69	6.5	2.32	0.77	7.66	5.9	N.D.	1.83	7.08	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Condition #4: (Effets de turbidité)																
Réplicat A	1.9	2.33	0.33	6.67	2.4	2.06	0.18	6.46	2.6	6.81	0.27	6.48	2.2	4.40	0.25	6.51
Réplicat B	6.3	2.23	0.20	6.49	11.0	2.24	0.27	6.48	6.2	4.69	0.76	6.56	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Condition #5: (Organisme-cible)																
Réplicat A	0.99	1.99	1.76	6.50	1.0	1.89	0.64	6.51	2.2	4.64	1.49	6.51	2.3	4.39	1.20	6.55
Réplicat B	3.4	1.88	0.86	6.49	1.9	2.15	0.42	6.51	3.7	5.30	1.68	6.55	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.

CHAPITRE 4

IMPACTS OF WATER QUALITY ON FREE CHLORINE EFFICACY IN SYNTHETIC WATERS

Ce chapitre présente les résultats d'essai de désinfection visant à établir les effets de la qualité de l'eau sur l'efficacité du chlore. Dans le but d'établir une base de comparaison solide, cette étude a été réalisée à l'aide d'eaux reconstituées au laboratoire. Ce chapitre a fait l'objet d'une publication dans la revue *Journal of Environmental Engineering & Sciences*. Les résultats bruts des essais sont disponibles aux annexes A et C.

EXAMINATION OF DISCRETE AND COUNFOUNDING EFFECTS OF WATER QUALITY PARAMETERS DURING THE INACTIVATION OF MS2 PHAGES AND *BACILLUS SUBTILIS* SPORES WITH FREE CHLORINE

Benoit BARBEAU^{*}, Debra HUFFMAN², Chandra MYSORE³

Raymond DESJARDINS¹ and Michele PRÉVOST³

- 1 Ecole Polytechnique de Montréal, NSERC Industrial Chair on Drinking Water, Civil Geological and Mining Engineering, CP 6079, Succ. centre-ville, Montréal (Québec), Canada, H3C 3A7
- 2 University of South Florida – College of Marine Science, St Petersburg, FL-33701
- 3 Veolia - North American Technology Center, Norcross, GA-30092

^{*} Corresponding author: tel: 1(514)340 4711 (#2988), fax: 1(514)340 5918, e-mail: benoit.barbeau@polymtl.ca

Abstract: The role of water quality (pH, temperature, turbidity and natural organic matter - NOM) on the efficacy of chlorine to inactivate *B. subtilis* spores and MS2

phages was investigated in synthetic waters. A half-factorial statistical experimental design was employed in order to reduce the number of assays. Temperature and pH were found to be by far the most important variables in explaining chlorine efficacy, that is 78% of the variability in the experimental domain studied (pH 6.5-8.5, $T = 7-22^{\circ}\text{C}$, $\text{DOC} = 0-5 \text{ mg/L}$, $0-5 \text{ NTU}$). The interaction between pH and temperature is also significant, being the third most important factor, explaining 11% of the variability. For both MS2 phages and *B. subtilis* spores, hypochlorous acid efficacy is less sensitive than hypochlorite ions to a modification of water temperature. Such effect is not taken into account in the current USEPA Ct tables. Once the consumption of disinfectant by NOM was taken into account, the presence of NOM had either no impact on MS2 phage inactivation or significantly improved *B. subtilis* spore inactivation. The role of inorganic turbidity was either not statistically significant or negligible. Little or no protection was therefore provided by kaolin particles, up to a concentration of 5 mg/L ($\approx 5 \text{ NTU}$).

Key words: Drinking water, disinfection, spores, MS2 coliphages, chlorine, water quality, turbidity, natural organic matter

4.1 INTRODUCTION

Although it has been shown that the use of free chlorine may lead to the formation of disinfection by-products, it is still, to this day, by far the most commonly disinfectant used in the world. A 1995 Community Water Systems Survey from the USEPA (1999) indicated that close to 70% of treatment plants providing post-disinfection relied on the use of free chlorine.

Over the last century, numerous studies have been conducted to evaluate the impact of water quality on chlorine chemistry and disinfection efficacy. Several environmental factors influence the inactivation efficiency of chlorine. Some of them influence directly the chlorination chemistry and thus, the inactivation mechanism (pH – Fair et al. 1947; Brazis et al. 1958; Györek et al. 1997; temperature – Faust and Aly 1998; Rennecker et al. 2000, ionic strength and other interfering substances, notably nitrogenous compounds). Other parameters influence the contact between the disinfectant and the cells (mixing, contact time – Watson, 1908; turbidity – Boardman and Sproul, 1977; LeChevallier et al. 1981; Ridgway et al. 1982; Berman et al. 1988; Herson et al. 1987; Clark et al. 1994; Gauthier et al. 2001; concentration of available chlorine – Chick, 1908; type of microorganism, initial concentration of microorganisms, Haas et al. 2002). Finally, the analytical methods (Boulos et al. 1999; Blackmer et al. 2000) or the physiological state of the microbes (Berg et al. 1985a; Berg et al. 1985b) used during the investigation may also play an important role.

The use of the Ct concept for the operation of water treatment plants marked an important turning point on the practice of drinking water disinfection. Following the publication of Ct tables by the USEPA (1989), the water industry began to adjust their chlorination practices based on pH and temperature. Water utilities soon realized that these two parameters greatly impact chlorine efficacy as the Ct value for 1 log *Giardia*

inactivation is increased 16-fold as water temperature drops from 25°C-pH 6.0 to 0.5°C-pH 9.0.

Turbidity and natural organic matter (NOM) are two other variables that can adversely impact chlorine efficacy. Turbidity may provide environmental protection for microorganisms by providing surfaces for attachment (Boardman and Sproul 1977; LeChevallier et al. 1981); as a primary drinking water standard, turbidity is considered as a surrogate for microbial removals and potential interference with disinfection efficacy. Besides exerting a significant overall disinfectant demand, NOM can further affect disinfectant chemistry, e.g. acting as a hydroxyl radical promoter or inhibitor during ozonation (Langlais et al. 1991). Although not directly included in the Ct tables, these parameters are taken into account indirectly in the current Ct calculation methodology. For one, Ct is computed using the free residual chlorine concentration, therefore conservatively taking into account the consumption by NOM, turbidity, and other interfering compounds. It is also mandatory that the turbidity be lower than 1 NTU to 5 NTU (depending on legislation) in order to ensure the efficiency of the disinfection process.

Little is known about the combinative (synergistic or antagonistic) effects of water quality variables on chlorine efficacy. Apart from the water chemistry governing different disinfectant species (e.g. pH action on chlorine), water quality may have a synergy or antagonism that affects microorganism survival following disinfectant application, e.g., hard waters in which calcium is present may bind to bacterial cell walls, affecting their surface chemistry and electrostatic interaction with charged disinfectant species. Haas et al. (1996) investigated the effectiveness of various disinfectants (ozone, chlorine, and monochloramine) on microbial inactivation in natural waters and concluded that the quality of source water is a significant factor in predicting disinfection effectiveness, although the variables causing these differences were not identified.

4.2 OBJECTIVES

The overall objective of this research was to study the impact of water quality parameters (pH, temperature, turbidity and NOM) on the inactivation of *B. subtilis* spores and MS2 coliphages by free chlorine in order to improve our comprehension of disinfection interference related to water quality. Turbidity and NOM were considered the most interesting parameters to study; yet the effects of pH and temperature were also sought in order to provide a baseline for comparison. This study was conducted in batch reactors utilizing synthetic waters.

4.3 MATERIALS AND METHODS

4.3.1 Experimental Design

Since a large number of variables was being investigated (4 water quality variables, 1 disinfectant, and 2 microorganisms), it was necessary to choose an experimental design that would minimize the number of experiments. A commercially available statistical software, (Statistica, Statsoft, 1998), was used to establish a statistical design that minimized the number of inactivation assays, as described by Box et al., 1978. This statistical approach identified the main parameters affecting the output variable under investigation, disinfection efficiency in this case, through a sensitivity analysis. For each variable, a mathematical model (Eq. 4-1) incorporated into the software calculates its relative importance in affecting the process under study.

$$Y(output) = \beta_0 + \sum_{j=1}^4 \beta_j x_j + \sum_{k=1}^3 \beta_k x_k + error \quad (Eq. 4-1)$$

This model describes the output variable, Y (Ct value for example), affected by the various process control variables (x_j) - pH, temperature, DOC and turbidity. The x_k variables represent the second-order interactions of the control variables $x_j * x_j$ (j, j'). The β_j and β_k coefficients are the fitting parameters calculated by the software from results accumulated during the laboratory experiments. For each parameter (and

associated interaction), the percentage of explanation of the variability was calculated using the appropriate β coefficients as shown by Equation 4-2.

$$X_a(\%) = 100 \times \frac{\beta_j^2 \text{ or } \beta_k^2}{\sum_{i=1}^4 \beta_i^2 + \sum_{i=1}^3 \beta_k^2} \quad (\text{Eq. 4-2})$$

As part of this disinfection study, the variables and outputs were:

- Process Control Variables: pH, turbidity, temperature, and total organic carbon (used as a proxy for NOM),
- Output or Response: Ct value for 2 log inactivation rate.

The utilization of such an experimental plan allowed to cut the number of experiments in half, and lead to a mathematical model linking the different variables with the experimental results. Table 4-1 presents the general statistical plan that was used for bench-scale assays in synthetic waters to study the inactivation of *Bacillus subtilis* spores or MS2 phages by free chlorine. As shown in Table 4-1, two variables were modified simultaneously from one assay to another. The statistical design was based on a partial factorial design with four water quality variables explored at two levels (minimum to maximum value). A ninth assay was added at the mid-range of each variable so as to evaluate the 2nd order (non-linear) interactions. For each disinfectant-microorganism combination, this partial factorial design was replicated for 3 to 4 initial disinfectant concentrations, therefore yielding a minimum of 9 assays x 3 dosages (or triplicates) = 27 assays per organism. The completion of the replicates was spanned over several months in order to increase the robustness of the data set.

Tableau 4-1: Description of each disinfection assay condition resulting from the statistical design.

Conditions	pH	Temperature (°C)	Turbidity (NTU)	DOC ¹ (mg C/L)
1	6.5	7	0	0
2	8.5	7	0	2 or 5
3	6.5	22	0	2 or 5
4	8.5	22	0	0
5	6.5	7	5	2 or 5
6	8.5	7	5	0
7	6.5	22	5	0
8	8.5	22	5	2 or 5
9	7.5	14.5	2.5	1 or 2.5
(Centered)				

1: The DOC concentration was set at 2.0 mg C/L for MS2 experiments and 5.0 mg C/L for *B. subtilis* spores experiments.

4.3.2 Synthetic Water Preparation

Synthetic waters were prepared using Milli-Q water that was pre-oxidized with free chlorine by adding 5 mg/L and letting react for 48 hours before eliminating the excess chlorine with UV light irradiation. A phosphate buffer with an ionic strength of 0.01 M was added to maintain the pH at 6.5 or 8.3. Borate buffer, also with an ionic strength of 0.01 M, was used to maintain the pH at 8.5. Kaolinite clay (Hydrite R grade) was used to induce turbidity in experimental waters; approximately 5 mg/L was used to create water having a target turbidity of approximately 5 NTU. This turbidity corresponds to a total particle count of roughly 15 000 particles/mL (measured by light obscuration, HACH WPC1900), with roughly 90% being in the 2-5 μm range. This turbidity level was chosen since it represents the maximum allowable turbidity for

unfiltered supplies. As kaolinite did not exhibit any disinfectant demand, it was used to induce turbidity and for studying the shielding effects available to microorganisms.

Natural organic matter (NOM) was purchased as a dry powder from the International Humic Substances Society, Golden-Colorado. The elemental composition of dry Suwannee River NOM was: 48.8 % C; 3.9 % H; 39.7 % O; 1.02 % N; 0.60 % S; 0.02 % P; 7.0 % Ash. A stock solution was prepared by dissolving the NOM in Mill-Q water filtered through a 0.22 μm filter. The stock solution was stored in a carbon-free glass flask at 4°C. NOM was added to experimental reactors after the experimental water had been autoclaved. Initially, a DOC concentration of 5 mg C/L (SUVA = 4.3) was chosen for assays conducted with *B. subtilis* spores. This high DOC concentration was chosen as being representative of a high case scenario for drinking water disinfection. However, this high concentration was found to induce high variability during MS2 experiments due to the difficulty of monitoring Cl_2 decay during the first 120 s, the typical duration of a disinfection assay with MS2. Therefore, the DOC concentration had to be lowered to 2 mg C/L in order to avoid this difficulty.

The organisms (*Bacillus subtilis* at a concentration of $10^{4.5}$ CFU/mL or viruses at 10^5 pfu/mL) were added to autoclaved test waters. Assays were performed separately for viruses and spores, in part due to the large difference in sensitivity of the two organisms. The spores or the viruses were added to the experimental waters 24 hours prior to the experiments and left continuously stirring at room temperature. This was done to maximize interaction of microorganisms with the DOC and kaolinite clay added to the experimental waters. Prior to the experiments, batch reactors were placed in a water bath to maintain a constant temperature for the duration of the experiments.

4.3.3 Microorganisms Culturing and Analysis

A culture of *Bacillus subtilis* was purchased from the American Type Culture Collection, ATCC#6633, and a single stock culture was prepared to use in all bench

scale inactivation experiments. A late Log phase suspension of *Bacillus subtilis* vegetative cells was prepared by inoculating Tryptic Soy Broth and incubating it at 35°C for 24h. R2A Agar (Becton Dickinson, Sparks, MD) was prepared according to manufacturer instructions. A 10^{-2} dilution of *Bacillus subtilis* vegetative cells was made in a standard phosphate buffer (Standard Methods 9050A) including 20 mg/L of MnCl_2 . MnCl_2 causes the vegetative cells to form dehydrated spores, which are considered to be a relatively resilient physiology (Setlow 1994). A small aliquot of the dilution (3 mL) was poured over the R2A media to form a thin layer. The vegetative bacteria were allowed to incubate at 35°C until >95% of the microorganisms had sporulated (7 days), as confirmed by phase contrast microscopy.

To harvest the spores, the R2A agar was flooded with phosphate buffer (pH 7.2) and sterile glass beads were used to scrape off the spore layer. The liquid was poured into centrifuge tubes and centrifuged at 3000g for 5 min. The spores were washed four times with phosphate buffer and 0.1% Tween-80. The final suspension was filtered using a 10- μm glass fiber filter in order to remove spore clumps. The stock was checked to ensure that the spores were mono-dispersed and that at least 99% of the cells were of spore morphology. The spore stock was stored at 4°C until used. A final experiment was conducted to replicate the initial experiment and confirmed that the spore stock did not change in sensitivity during the time frame of the experiments.

For spore enumeration, biological samples were quenched in 1% (w/w) sodium thiosulfate and enumerated using a modified vacuum plate filtration method (Barbeau et al. 1997). This modified plate filtration method used Tryptic Soy Broth (Becton Dickinson, Sparks, MD), including tetrazolium tri-chloride, to improve visualization of the colonies by dyeing the colonies red. After the spores were filtered and placed on a nutrient pad, they were pasteurized in a water bath. The plates were then placed in a 37°C incubator for 24 hours and counted.

MS2 phages (ATCC # 15597B) were prepared from infected lawns of host *Escherichia coli* (ATCC # 15597). MS2 phages produce plaque-forming units but only grow on their host (*Escherichia coli*). High titers of phage (10^{13} pfu) were prepared by inoculating 1L flasks of TSB with the host bacterium in growth phase and incubating with the phage (with a ratio of virus to host of 0.01). After 24 hours on a shaker flask, the cells were centrifuged and the supernatant was filter-sterilized.

To enumerate MS2 phages, the host bacteria (*E. coli*, ATCC # 15597) were grown to stationary phase in TSB and added to the virus sample and soft agar overlay, mixed and spread on to agar plates. After this had solidified, the plates were inverted and incubated at 37°C overnight. The plaques were enumerated, similar to colony counts for bacteria. Samples (10 mL) were stabilized by adding concentrated TSB (150 g/L) (1 ml TSB/ 100 ml of sample) and shipped overnight to the University of South Florida for enumeration, where they were assayed upon reception. If necessary, samples were diluted in PBS and assayed in duplicate. The average plaque-forming unit per milliliter was calculated. Positive controls were conducted using MS2 stocks. Negative controls consisted of plating 1.5 mL of host with clean water samples. An MS2 stock was also employed as a trip control during transportation.

4.3.4 Oxidant Preparation and Analysis

Stock chlorine solution was prepared at a concentration of 15,000 mg/L using 5.5% aqueous sodium hypochlorite solution. On the day of the experiment, this solution was diluted to yield a final concentration of 150 mg/L. It was stored in dark conditions prior to use. The oxidant concentration was measured using the DPD colorimetric method (Standard Methods, 1998).

4.4 RESULTS

4.4.1 Water Quality Variables Investigated

Table 4-2 shows the actual water quality measured during the inactivation assays for each of the nine individual disinfection conditions. Temperature was maintained within $\pm 0.5^\circ\text{C}$ of the target temperature. A concentration of 5 mg/L of kaolin induced a turbidity of approximately 5 NTU. For *Bacillus subtilis* spores, the targeted DOC concentration (5.0 mg/L) was achieved, while the DOC concentration during MS2 assays was slightly higher than the targeted value (2.4 vs. 2.0 mg C/L), although it was reproducible from one condition to another. The variability in DOC concentration was $\pm 5\%$ from one condition to another, while the pH was maintained within ± 0.1 units of the targeted value.

Tableau 4-2: Description of disinfection assay conditions (actual measured values).

Experimental condition	<i>Bacillus subtilis</i> spores				MS2 phages			
	pH	T ($^\circ\text{C}$)	Turbidity (NTU)	DOC (mg C/L)	pH	T ($^\circ\text{C}$)	Turbidity (NTU)	DOC (mg C/L)
1	6.5	7.3	< 0.05	< 0.2	6.5	7.0	< 0.05	< 0.2
2	8.3	7.0	< 0.05	5.09	8.5	7.0	< 0.05	2.58
3	6.5	22.0	< 0.05	5.14	6.5	21.5	< 0.05	2.28
4	8.3	23.0	< 0.05	< 0.2	8.5	21.5	< 0.05	< 0.2
5	6.5	7.0	7.2	4.94	6.5	7.0	5.3	2.36
6	8.1	7.2	6.5	< 0.2	8.5	7.0	5.2	< 0.2
7	6.5	22.3	4.6	< 0.2	6.5	21.5	5.0	< 0.2
8	8.3	22.0	5.6	5.28	8.5	22.0	5.2	2.42
9 (Centered)	7.5	14.5	2.8	3.02	7.5	14.5	3.1	1.6

4.4.2 Modeling Inactivation Kinetics

The effective Ct (the area under the decay curve at time t) was used to describe the observed inactivation data. For each microbiological observation (N/N_0), the integrated Ct is calculated as the area under the disinfectant decay curve at that time using a continuous function. Due to the presence of an initial lag phase, the inactivation of *Bacillus subtilis* spores with free chlorine was best modeled using the Chick-Watson equation (with delay), as described by Equation 4-3:

$$\text{Log}\left(\frac{N}{N_0}\right) = -k \times (Ct_{\text{effective}} - Ct_{\text{lag}}) \quad (\text{Eq. 4-3})$$

Where N/N_0 = the remaining fraction of the spore population

Ct = the integrated Ct value

k = the inactivation rate, an adjustment parameter obtained by regression analysis

Ct_{lag} = the lag phase, an adjustment parameter obtained by regression analysis.

The observed inactivation data of *B. subtilis* spores and MS2 phages are shown in Figure 4-1. In the case of MS2 phages, no lag phase was observed and therefore, Ct_{lag} was set to zero. Due to the large number of inactivation data (over 50 reactors assayed), Figure 4-1 shows only the observed results for disinfection condition #1 (3 reactors with MS2 and 3 reactors with spores). As shown in Fig. 4-1, MS2 phages are very sensitive to free chlorine. Ct values used for condition 1 were roughly 1000 times lower than for spores (0.5 vs 500 mg.min/L).

For both organisms, the reproducibility, expressed with respect to the average log Ct values for 2 log inactivation, was excellent (2-13% for spores and 6-18% for MS2, depending on the condition). Consequently, the inactivation data for a given condition were modeled yielding a high coefficient of correlation. Table 4-3 presents a summary of the relevant modeling parameters obtained for each of the 27 reactors assayed (9 conditions in triplicate – with variable initial chlorine concentration).

Tableau 4-3: Inactivation kinetic parameters derived using the effective Chick-Watson model for *Bacillus subtilis* spores and MS2 coliphages.

Conditions	<i>B. subtilis</i> spores				MS2 coliphages		
	<i>k</i>	<i>Ct_{lag}</i>	<i>Ct-2 Log</i>	<i>R</i> ²	<i>k</i>	<i>Ct-2 Log</i>	<i>R</i> ²
	(L.mg ⁻¹ .min ⁻¹)	(mg.min/L)	(mg.min/L)		(L.mg ⁻¹ .min ⁻¹)	(mg.min/L)	
1	1.02E-02	172	320	0.960	7.68	0.26	0.90
	1.33E-02		330	0.998	11.1	0.18	0.97
	1.16E-02		365	0.990	9.81	0.20	0.88
2	1.64E-03	644	1691	0.933	0.57	3.49	0.97
	2.08E-03		1972	0.994	0.59	3.39	0.86
	1.99E-03		1655	0.984	0.68	2.93	0.96
3	5.42E-02	51	84	0.933	14.3	0.14	1.00
	6.64E-02		84	0.994	23.7	0.08	0.93
	6.27E-02		81	0.990	25.9	0.08	0.96
4	-	480	-	-	22.0	0.09	0.73
	6.70E-03		775	0.978	1.57	1.28	0.86
	4.83E-03		937	0.992	1.64	1.22	0.89
5	4.40E-03	139	1015	0.984	1.50	1.33	0.72
	-		-	-	1.43	1.40	0.98
	2.15E-02		270	0.998	10.5	0.19	0.99
6	1.54E-02	1111	259	0.980	16.0	0.13	0.51
	1.70E-02		219	0.922	18.7	0.11	0.94
	-		-	-	23.0	0.09	0.80
7	2.16E-03	48	2209	0.953	0.77	2.59	0.89
	1.57E-03		2409	0.988	0.60	3.36	0.92
	1.67E-03		2344	0.982	0.75	2.68	0.80
8	-	433	-	-	0.86	2.33	0.80
	4.72E-02		95	0.994	15.9	0.13	0.97
	3.40E-02		110	0.986	13.6	0.15	0.99
9	4.01E-02	95	107	0.980	14.3	0.14	0.73
	1.54E-02		601	0.986	2.92	0.69	0.97
	9.31E-03		648	0.962	3.33	0.60	0.88
9	7.60E-03	209	691	0.972	3.29	0.61	0.69
	1.54E-02		252	0.994	Not done		
	2.95E-02		209	0.990			

Note: raw data are presented in Appendix A and C

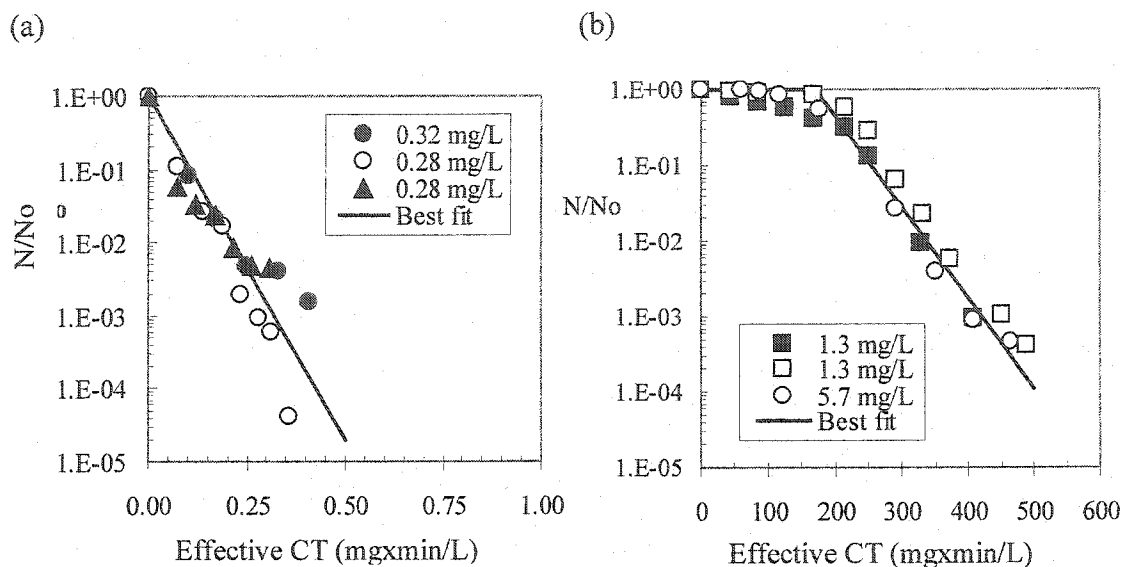


Figure 4-1: Inactivation of (a) MS2 coliphages and (b) *Bacillus subtilis* spores with free chlorine. Condition #1: pH 6.5, temperature 7°C, turbidity 0 NTU and DOC 0 mg C/L. Numbers in inset refer to the average chlorine residual concentration in mg/L in the reactors.

4.4.3 Analysis of Variance (ANOVA)

An ANOVA analysis was performed in order to evaluate the water quality (process control) variables producing a significant effect on the Ct 2-Log value and the Ct_{lag} (output variables). The standardized effects produced by the water quality variables are included in Table 4-4. The standardization of effects is simply the process by which the effects are divided by their respective standard error and are consequently a-dimensional. These values indicate the effect caused by modifying the water quality from its lowest to its highest set point. By doing so, it becomes possible to compare the various effects, taking into account experimental error, similarly to a signal to noise ratio.

For example, considering the inactivation of *Bacillus subtilis* spores by free chlorine, increasing the pH from 6.5 to 8.3 caused an increase in the Ct-2 Log value of 1193 ± 23.4 mg.min/L. The standardized effect is therefore $1193 \div 23.4 = 51$, as indicated in Table 4-4. A positive sign means that increasing/decreasing the water quality parameter will also increase/decrease the effect on the output variable, while a negative sign suggest an opposite effect. For example, temperature has a negative impact on the Ct value: increasing water temperature will decrease the Ct value required for inactivation.

The level of significance (at probability, $p = 0.05$) is calculated by Statisticatm, using the experimental matrix and the error term. For both MS2 phages and *Bacillus subtilis* spores, a control variable (pH, for example) had to produce roughly a two-fold effect above experimental error to be considered statistically significant.

Tableau 4-4 Standardized effects of selected control variables (water quality) on the output variables (Ct-lag phase, Ct-2 Log values) for *Bacillus subtilis* spores and MS2 phages.

Control variables	Output variables		
	MS2 phages	<i>B. subtilis</i> spores	
	Ct-2 Log (mg.min/L)	Ct-Lag phase (mg.min/L)	Ct-2 Log (mg.min/L)
pH (6.5 to 8.3-8.5)	29	15	51
Temperature (7 to 22°C)	-16	-7.0	-30
DOC (0 to 2-5 mg/L)	-1.1	-3.6	-11
Turbidity (0 to 5 NTU)	-5.0	2.1	3.4

Note:

1. A negative sign indicates that an increase in the control variable results in a decrease in the output variable.
2. Bold values indicate that the effect of the control variable was not significant at $p = 0.05$. Level of significance is set at 2.1.

Table 4-5 presents the sensitivity analysis derived from the ANOVA for each variable in the statistical model. The dominant role of pH and temperature is shown by the fact that these two variables account for 75-78% of the variability. The combined effects of pH and temperature explain 80 to 95% of the variability, depending on the output variable analyzed. Although the impacts of turbidity and DOC were statistically significant (with the exception of DOC on MS2), their contribution to the model is minor, varying from 0.1 to 3.5%

Tableau 4-5: Sensitivity analysis: Percentages of explanation of the selected control variables (water quality) on the output variables (Ct-lag phase, Ct-2 Log values) for *Bacillus subtilis* spores and MS2 phages.

Control variables	Output variables		
	MS2 phages	<i>B. subtilis</i> spores	
	Ct-2 Log (mg.min/L)	Ct-Lag phase (mg.min/L)	Ct-2 Log (mg.min/L)
pH	59%	62%	58%
Temperature	19%	13%	20%
Interaction pH×temp	17%	5.5%	11%
DOC	0.1% [#]	3.5%	2.6%
Turbidity	1.7%	1.4%	0.3%
Other interactions	1.5%	10%	7.8%
Unexplained variance	1.7%	4.8%	0.4%
TOTAL	100%	100%	100%

[#]: No significant impact at $p=0.05$

The following inferences can also be made from Tables 4-4 and 4-5. In general, the conclusions with respect to the relative importance of each water quality variable on spores' inactivation were the same whether the analysis was based on the lag phase or the Ct-2 log value. The main difference was that Ct required to overcome the lag phase was less sensitive to water quality than the Ct 2-Log (smaller effects for Ct_{lag} are shown in Table 4-4). Spore inactivation requires the disinfectant to first react with the spores' coat. This initial step might be limited more by disinfectant diffusion through the spore's coat rather than water quality. This hypothesis would explain the lower dependency of Ct lag phases on water quality.

Concerning the respective importance of the control variables:

1. pH and temperature are by far the most dominant factors, the effect of pH being roughly twice that of temperature.
2. DOC had a surprising effect. DOC had a significant impact on *Bacillus subtilis* spore inactivation. An increase in DOC appears to favor a decrease in Ct values, which indicates enhanced disinfection in moderate to high DOC waters. However, as discussed earlier, the impact on Ct, although statistically significant, was minor (28% reduction in Ct 2-Log) compared to temperature (163% increase) or pH (616% increase). For MS2 phages, the effect of DOC on Ct values was not statistically significant.
3. Inorganic (non reactive) turbidity was the least important variable. Its impact on the inactivation of *Bacillus subtilis* spores was negligible (< 11% in Ct 2-Log following a 5 NTU increase). As for MS2 phages, an increase in turbidity led to a lower Ct value. This result was explored in detail and results are presented in the sections to follow.

4.4.4 Impacts of water quality on the aggregation of microorganisms

Water quality can influence the surface charge of microorganisms and, in turn, promote clumping or adsorption to the kaolin particles. This phenomenon was

investigated by testing if the ratio of the microorganism concentrations measured after 24 hours of contact time with the water matrix divided by the initial counts ($t = 5$ min) were significantly influenced by pH, temperature, NOM or turbidity. It was hypothesized that if significant clumping and/or particle-organism interactions were present, this ratio would be less than unity and might depend on water quality. In the case of MS2, it was found that temperature and TOC both had a significant impact (at $p=0.05$) on this ratio, while turbidity ($p=0.84$) and pH ($p=0.15$) did not. For *B. subtilis* spores, the counts were slightly lower after 24 hour (4.43 log/mL vs 4.50 log/mL at $t=5$ min, $p < 0.01$). Yet, this difference could not be attributed to any specific water quality variable.

4.4.5 Data Analysis Using Statistical Models

For each microorganism, a statistical model was created to predict the Ct-2 Log values for various water quality parameters. The Ct-2 Log inactivation values were chosen for this analysis, as they are commonly quoted values in the literature. Statistica[™] produces this statistical model, which is a best-fit linear regression of the control variables (pH, temperature, etc.) and their associated 2nd order non-linear interactions. The non-linear interactions are mathematically expressed as the product of two variables (pH \times temperature, for example).

The proposed statistical models were found to accurately describe the data. Table 4-6 provides the prediction equations. Figure 4-2 compares observed and predicted Ct-2 Log values for the two microorganisms under investigation. The correlation between the predicted and observed values is excellent, indicating that the control variables (pH, temperature, etc.) adequately described the observed Ct variations. These models will be used in the following sections in order to describe the impact of each individual water quality variable.

Tableau 4-6 :Statistical equations predicting the required Ct value for 2 Log inactivation of MS2 phages and *Bacillus subtilis* spores under various water quality conditions

Microorganisms	Statistical model predicting Ct value for 2 Log inactivation	R ²
<i>Bacillus subtilis</i>	$\text{Ct-2 Log} = -7477.2 + (1210.5 \times \text{pH}) + (237.84 \times \text{Temperature}) - (94.84 \times \text{DOC}) + (93.19 \times \text{Turbidity}) - (37.75 \times \text{pH} \times \text{Temperature}) - (5.332 \times \text{Temperature} \times \text{Turbidity}) + (3.023 \times \text{Temperature} \times \text{DOC})$	0.99 (N=27)
MS2 phage	$\text{Ct-2 Log} = -12.065 + (1.8717 \times \text{pH}) + (0.4435 \times \text{Temperature}) + (0.2442 \times \text{DOC}) - (0.0600 \times \text{Turbidity}) - (0.0658 \times \text{pH} \times \text{Temperature}) - (0.019 \times \text{Temperature} \times \text{Turbidity})$	0.98 (N = 28)

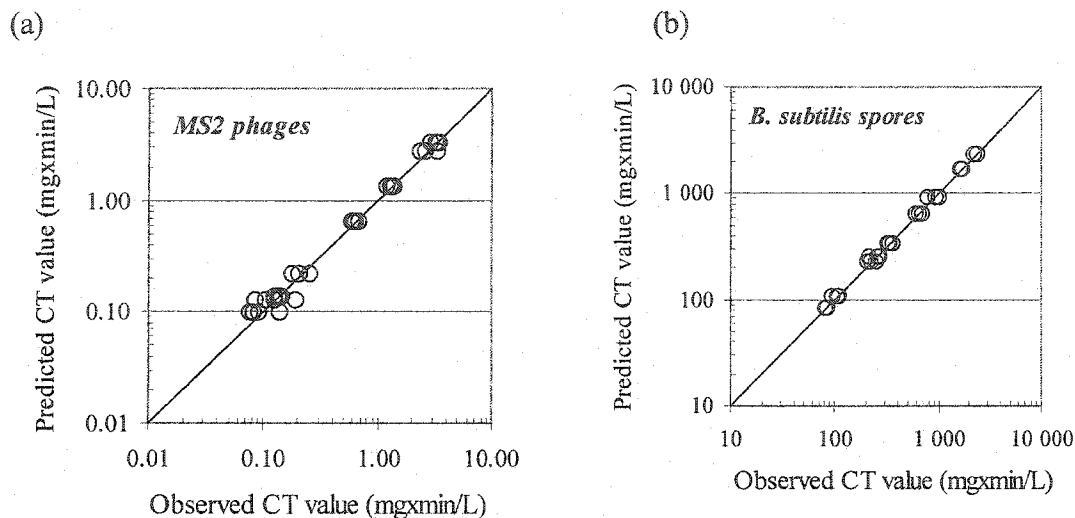


Figure 4-2: Predicted versus Observed Ct values for 2 Log inactivation of MS2 phages ($r^2 = 0.98$) and *Bacillus subtilis* spores ($r^2 = 0.99$) based on the statistical model.

4.4.5.1 Impact of pH and Temperature on Chlorine Efficacy

As concluded from the ANOVA, pH and temperature were the two main factors impacting chlorination efficiency. As can be observed on Figure 4-3 (Ct-2 Log results without DOC or turbidity), the temperature effect is strongly pH-dependent: the effect of temperature on disinfection efficacy was more pronounced for increasing pH values. For MS2, at the lowest pH of 6.5, the model even predicts an increase in Ct value when temperature increases. However, this phenomenon was not statistically significant, as the values were within the experimental error (illustrated by the two dashed lines in Figure 4-3). At pH 6.5, low contact times (< 30 sec) and low chlorine concentrations (< 0.2 mg/L) were necessary to achieve a 2 Log inactivation, thereby increasing the experimental error.

For *Bacillus subtilis* spores at the lower pH of 6.5, the increase in Ct value (multiplier) caused by a 10°C decrease in temperature (from 25°C to 15°C), also often

referred to as the Q_{10} in the literature, was 1.37. At the higher pH (8.5), the Q_{10} was 2.12 for *Bacillus subtilis* spores and 1.75 for MS2 phages. Interestingly, it seems that the adverse effect of temperature on disinfection efficiency is not as strong for bacterial spores when compared to other microorganisms. Considering that Q_{10} values range generally from 2 to 4 depending on the disinfectant used and the target microorganism (Butterfield et al. 1943; Fair et al. 1948, Haas and Karra 1984; Hoff 1986; USEPA 1989; Sobsey 1989; Corona-Vasquez et al. 2000; Rennecker et al. 2000), we can conclude that temperature has a relatively weak impact on *Bacillus subtilis* inactivation when compared to that observed for other microorganisms. The calculated Q_{10} values for spores (1.37 - 2.12) are consistent with previous studies: Barbeau et al. (1999) calculated a Q_{10} value of approximately 1.7 (at pH 7.0) for *Bacillus subtilis* spores while Finch and Choe (1999) had a value of 1.5 for *Bacillus cereus* spores at a pH of 6.5.

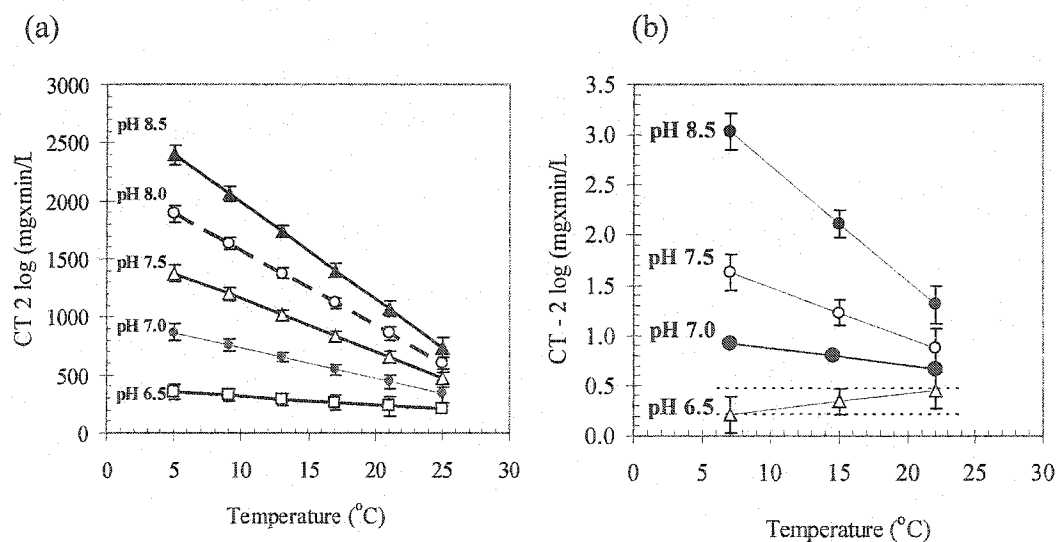


Figure 4-3: Impact of pH and temperature on the inactivation of *Bacillus subtilis* spores (left) and MS2 phages (right) by free chlorine. The error bars represent the 95th confidence interval. Turbidity < 0.05 NTU, DOC < 0.2 mg C/L.

4.4.5.2 Impact of Turbidity on Chlorine Efficacy

Natural turbidity was simulated by adding 5 mg/L of kaolin. Kaolin does not react with free chlorine, and this was confirmed in the laboratory. Hence, any decrease in disinfection efficiency would suggest a mechanism by which spores or viruses are physically protected from the action of the disinfectant.

As described by the ANOVA, the overall impact of turbidity was negligible compared to other water quality variables. Figure 4-4 illustrates the impact on Ct-2 Log values produced by increasing turbidity from <0.05 to 5 NTU for the low and high water temperature conditions.

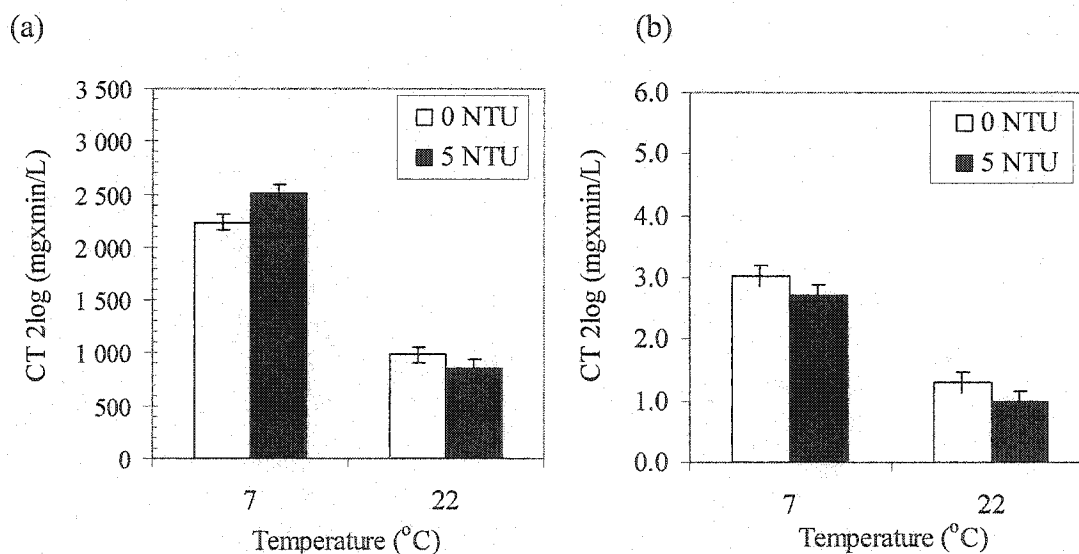


Figure 4-4: Impact of inorganic turbidity on the inactivation of *Bacillus subtilis* spores (left) and MS2 phages (right) by free chlorine for various water temperatures (pH = 8.5, DOC = 0 mg/L). The error bars represent the 95th confidence interval on the predicted model CT-2 log (cf. Table 4-6).

For *Bacillus subtilis* spores, a 5 NTU turbidity did not produce any significant impact ($p < 0.05$) under warm water conditions (22°C). As temperature decreased from 22°C to 7°C, the impact of turbidity increased. At 7°C, the impact of turbidity,

although modest, became significant according to the model ($p > 0.05$). The greatest impact was at the lowest temperature (7°C), for which increases in Ct-2 Log values of 83% (338 to 617 mg.min/L) and 13% (2231 to 2510 mg.min/L) at a pH of 6.5 and 8.5 were respectively observed.

According to Figure 4-4, a small decrease in the Ct required to inactivate 2 log of MS2 is predicted following an increase in turbidity from < 0.05 to 5 NTU for all scenarios. However, the impact of turbidity (11 - 34%) was close to the experimental error and it was therefore decided to run additional assays using three reactors (0, 2.5 and 5.0 NTU at pH 8.5 and 22°C) in order to verify these findings. According to this work (data not shown), no clear impact of turbidity was observed, the fastest inactivation being observed for the average turbidity reactor (2.5 NTU). The average Ct-2 Log value for these 3 reactors was $1.31 \text{ mg.min/L} \pm 15\%$. From this second round of assays, it was concluded that the observed impact of turbidity was most likely attributable to experimental variability rather than to intrinsic effects of kaolin.

4.4.5.3 Impact of Natural Organic Matter on Chlorine Efficacy

The influence of NOM was simulated by adding Suwannee River NOM extract at a target concentration of 5 mg C/L (spores) or 2 mg C/L (viruses). NOM exerted a significant disinfectant demand and, consequently, higher disinfectant dosages had to be employed under these conditions. Moreover, NOM concentration had to be reduced from 5 to 2 mg C/L when it became apparent that the rapid initial chlorine decay at 5 mg C/L affected the reproducibility of phages inactivation data.

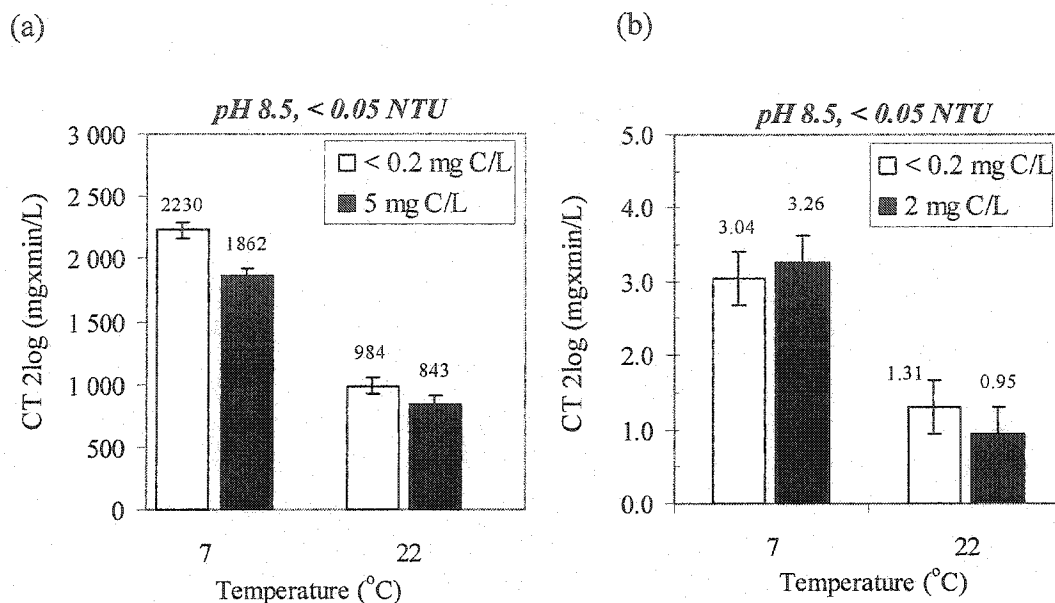


Figure 4-5: Impact of NOM (quantified as DOC) on the inactivation of *Bacillus subtilis* spores (left) and MS2 phages (right) at various temperatures. Error bars represent the 95th confidence interval.

After pH and temperature, DOC was the third most important variable to impact *Bacillus subtilis* spore inactivation with free chlorine. However, the effect of DOC was unexpected: an increase in DOC caused a significant reduction in the Ct value required for 2 Log inactivation. Hence, it appeared that disinfection was enhanced in the presence of DOC. However, it is important to note that the observed effect of DOC was limited to a reduction in Ct value of 28% (average). For example, Figure 5 indicates a Ct decrease of approximately 141 to 368 mg.min/L under the high DOC (5 mg/L) condition, at 22°C and 7°C, respectively. This effect was not influenced by pH (data not shown). Moreover, this observation was only valid for spores, as DOC did not have any significant impact on the inactivation of MS2 phages (Figure 4-5).

4.5 DISCUSSION

The synergistic/antagonistic effects of water quality variables have received little attention in the past, mainly due to the large numbers of variables impacting disinfection efficiency. During this project, it was shown that pH and temperature were not acting independently on chlorine efficacy to inactivate MS2 phages and *B. subtilis* spores. The pH effect on the Q_{10} value can most likely be explained by chlorine chemistry. As pH increases, hypochlorous acid (HOCl) dissociates to form hypochlorite ions (OCl⁻). As both chemical species are known to be very different in their disinfection effectiveness, it is likely that they are also influenced differently by a decrease in temperature. According to our results, disinfection at a lower temperature would be more effective when using hypochlorous acid as compared to hypochlorites. This pH effect has not been taken into account in the Ct tables developed by the USEPA. The Q_{10} value was set at 2.0 for *Giardia* and viruses, regardless of pH. However, earlier work conducted by Butterfield et al. (1943) and Fair et al. (1948) had also documented such behavior while studying *E. coli* inactivation.

The decrease of hypochlorite ion efficiency can also be investigated by calculating the relative efficiency of hypochlorous acid over hypochlorite ions (HOCl/OCl⁻) for a given temperature. This calculation is based on (i) the proportion of the two chlorine species at various pHs and temperatures according to Morris (1966) and (ii) the assumption that no synergy exists between the two chlorine species. For spores, this calculation yielded a relative disinfection efficiency of 6.8 at T=22°C and 12 at T=7°C, meaning that hypochlorous acid is 6.8 times or 12 times more efficient than hypochlorite ions, respectively, depending on water temperature. Using data from Brazis et al. (1958) and Finch et al. (1999), we calculated a relative efficiency ratio of 2.7, 2.3 and 16.9 for *Bacillus cereus*, *Bacillus anthracis* and *Bacillus globigii* spores, respectively. Interestingly, *Bacillus globigii*, which exhibits similar results to our data with *Bacillus subtilis*, is actually a variety of *Bacillus subtilis* (ATCC, 2003; NIBC, 2003).

The impact of increasing turbidity from < 0.05 to 5 NTU was either not significant or the least important variable out of the four water quality parameters studied. Published literature on the protective effect afforded by inorganic turbidity on inactivation of viruses varies from a two-fold protective effect (Scarpino et al. 1972; Stagg et al. 1977) to no measurable protective effect (Boardman and Sproul 1977). Gauthier et al. (1999) also observed no significant protection to chlorination for *Sphingomonas sp.* attached to goethite particles. Kaolin, used to induce inorganic turbidity, does not consume the disinfectant residual. Therefore, the minimal impact of kaolin suggests that the protection provided by particle-organism interaction did not provide a large degree of protection. The kaolin particles, the spores of *B. subtilis* and MS2 phages all exhibit highly negative surface charge in the pH region employed during this project (6.5-8.5). The isoelectric points (point of zero charge) have been reported to be approximately 2.0, 3.5 and 2.8-3.8 for *B. subtilis* spores, MS2 phages and kaolin particles, respectively (Ahimou et al. 2001; Hu and Liu 2003). This information is coherent with the minimal observed impact of turbidity on microbial counts, which suggests only minor interaction of the organisms with the kaolin particles.

The USEPA Ct tables already include a 1.5 – 2.0 safety factor, which should cover the potential impact of organism attachment to particles. However, it is important to note that natural turbidity should still be minimized before final disinfection. Natural turbidity (as opposed to kaolin) will (1) consume disinfectant residual and (2) may protect pathogens due to their inclusion inside particles or within higher organisms.

The current project also identified that NOM was favouring the ability of chlorine to inactivate spores. To explain this result, several potential explanations were identified and are discussed hereafter:

- *The presence of DOC interfered with the analytical detection of spores.*

The seeding control reactors with DOC (no disinfectant added) did not exhibit any decrease in viability. This factor was therefore eliminated.

- *DOC reacted with chlorine to form disinfectant by-products, and the inactivation rate of *Bacillus subtilis* spores was enhanced.*

Free chlorine residuals were measured during the assays – not total chlorine residuals. If monochloramines were formed, they would act in synergy with free chlorine to enhance the rate of spore inactivation. Yet, this hypothesis seems unlikely when one considers the extreme resistance of *Bacillus subtilis* spores to chloramines. Finch et al. (1998) did demonstrate synergistic effects of free chlorine and monochloramine on *Giardia muris* inactivation at 5°C and pH 8.0. However, the monochloramine average concentration was 2.0 mg/L for a Ct of 296 mg.min/L during their experiment, leading to significantly higher disinfection conditions.

- *NOM interfered with the disinfectant residual measurement and therefore, could have biased the Ct calculations.*

If NOM (or turbidity) actually interfered with chlorine residual analysis, the effect would be an over-estimation of the true residual (due to the absorbance of NOM or kaolin at 515 nm). A correction for such effect would reduce our actual effective Ct values and, therefore, increase the difference between the NOM and NOM-free conditions. Some additional assays were done to evaluate such bias. It was found that NOM had no impact on the detection of chlorine residual but kaolin (at 5 mg/L) did result in a modest over-estimation (approximately 6%). Hence, this hypothesis was not given any further consideration.

- *The observed effect was induced by the inactivation kinetic model employed (the effective Ct model).*

As discussed earlier, higher disinfectant dosages were used in the presence of NOM in order to maintain enough chlorine residual in the reactor. Spores inactivation was described using a Chick-Watson model with an n value equal to 1

($C^n t$). If the n value differed slightly from 1, the dosage would have an impact on the calculated Ct value: Ct values obtained at a higher dosage would be different than Ct values obtained at lower concentrations. Inactivation data were re-analyzed by including n as a parameter in the model. The results indicated no significant difference ($p = 0.75$) for n values in reactors with or without NOM. The average n values ($N=12$) were 1.08 and 1.15 for reactors with and without NOM, respectively. However, it was also observed that the n value was always higher than 1, suggesting that the concentration is more important than contact time and it could explain the observed impact of NOM, as chlorine dosages were significantly higher for conditions including NOM (6.5 vs 4.7 mg Cl_2/L).

Even though (i) chlorine concentrations have a slight impact on the $C^n t$ value (with $n \neq 1$), and (ii) they were higher for DOC-enriched waters, this effect is not deemed sufficient to fully account for the observed NOM impacts. The average chlorine in reactors without DOC was equal to 72% of the average chlorine concentration in reactors with DOC. It was found that this discrepancy could produce 10% lower Ct values for reactors with DOC. However, the impact of DOC was a reduction of the Ct value required for 2 Log inactivation by about 28% (average). Yet, considering that the impact of NOM was close to the significance level, this 10% effect may have been enough to make a difference.

To confirm the impact of DOC, an additional set of assays were conducted using an identical initial chlorine dosage for duplicate reactors with or without DOC. These assays, presented in Figure 4-6, were completed at low and high water temperatures (pH 6.5, no turbidity). These results support the conclusion that NOM does not enhance or decrease disinfection efficiency, as long as chlorine decay is taken into account and the initial chlorine dosage is identical. The results exhibited good reproducibility. Only for the reactor at 22°C, a slightly higher Ct -2 Log value was observed for the reactor A1 (without DOC). However, at the lower temperature, all

reactors exhibited the same inactivation kinetics. Hence, based on these additional assays, NOM does not have a great impact on the effective Ct value, although the initial dosage may have an impact on the Ct value. This may explain the results observed during the initial experiments, since the initial chlorine concentration was not kept at a constant value.

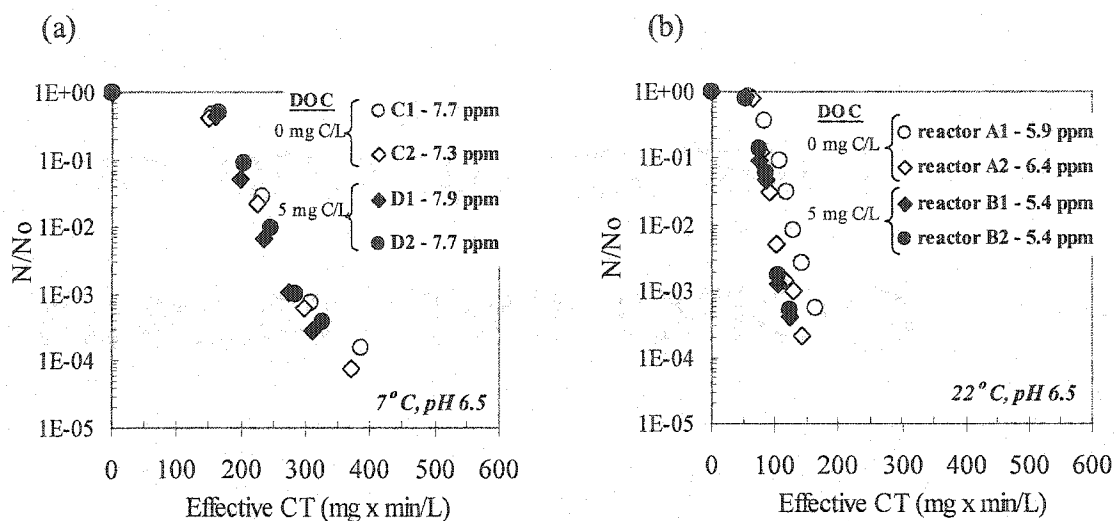


Figure 4-6: Assays to confirm the impact of DOC on *Bacillus subtilis* spores inactivation using free chlorine at 7°C (left) and 22°C (right) Note: A1 and A2 (etc.) denote duplicate reactors. Turbidity < 0.05 NTU. Average chlorine dosages during the assays are provided in the legend.

4.6 CONCLUSIONS

The role of water quality (pH, temperature, turbidity and natural organic matter) on the efficacy of chlorine to inactivate *B. subtilis* spores and MS2 phages was investigated in synthetic waters. A statistical experimental design (half-factorial design) was employed in order to reduce the number of assays and evaluate interactions between water quality variables. Disinfection efficacy was described using a simple Chick-Watson model (with a lag phase for *B. subtilis* spores). The effective

concentration concept (McGrath and Johnson 1979), which describes the microbiological dose as the area under the disinfectant decay curve, was used in the model.

From the statistical analysis, the following conclusions were established:

- Temperature and pH were the most important variables to impact chlorine efficacy, explaining 75-78% of the variability in the experimental domain studied (pH 6.5-8.5, T 7-22°C, 0 - 5 mg C/L, 0 - 5 NTU).
- The interaction between pH and temperature was also highly significant. Its impact increases up to 80-95% in the model when this interaction is taken into account.
- For both MS2 phages and *B. subtilis* spores, hypochlorous acid (HOCl) efficacy was less sensitive than hypochlorite ions (OCl⁻) to a change in water temperature. Such effect is not taken into account in the current USEPA Ct tables.
- In the case of spores, the Ct required to overcome the lag phase was less sensitive to water quality than the Ct for 2 log inactivation. This difference may be indicative of disinfectant mass-transfer limitations in the spore's coat.
- After the consumption of disinfectant by NOM is taken into account, the presence of natural organic matter had no impact on MS2 phage inactivation or significantly improved *B. subtilis* spore inactivation. However, in the latter case, part of this improvement appears to be kinetic-dependent (related to the initial concentration of disinfectant used).
- The role of inorganic turbidity (induced using kaolin) was negligible compared to the other three water quality variables. Little or no protection was therefore provided by kaolin particles up to a concentration of 5 mg/L (\approx 5 NTU). The role of turbidity is most likely dependant on the origin of turbidity, as related to

its capacity to interact with the organisms. During this project, turbidity did not interact significantly with MS2 phages and *B. subtilis* spores.

In summary, the impacts of turbidity and natural organic matter were small compared to the effects of temperature and pH; the current safety margin (1.5-2.0 fold) included in the USEPA Ct tables is a reasonable account of their impact. However, there should be more focus on pH-temperature interactions on chlorine efficiency, as lower water temperatures were more detrimental to hypochlorites than hypochlorous acid.

Acknowledgements: This study was funded by the American Water Works Research Foundation and the NSERC-Industrial Chair on Drinking Water of École Polytechnique de Montréal. The Chair is funded jointly by the City of Montreal, John-Meunier/USFilter/Vivendi Water, the City of Laval, Triax consultants and the National Science and Engineering Research Council. We also wish to thank Mélanie Rivard for her valuable technical assistance in the completion of the bench-scale assays.

4.7 REFERENCES

- Ahimou, F., Paquot, M., Jacques, P., Thonart, P. and Rouxhet, P.G. 2001. Influence of electrical properties on the evaluation of the surface hydrophobicity of *Bacillus subtilis*. *Journ. Microbiol. Mthds.* **45**:119-126.
- American Type Culture Collection. 2003.
<http://www.atcc.org/SearchCatalogs/Search.cfm>
- Barbeau, B., Boulos, L., Desjardins, R. Coallier, J. and Prevost, M. 1999. Examining the use of aerobic spore-forming bacteria to assess the efficiency of chlorination. *Water Research.* **33**(13): 2941-2948.
- Berg, J.D., Hoff, J.C., Roberts, P.V. and Matin, A. 1985a. Disinfection resistance of *Legionella pneumophila* and *Escherichia coli* grown in continuous and batch

- culture. Water chlorination: Chemistry, environmental impact and health effects. **5**:603-613.
- Berg, J.D., Roberts, P.V. and Matin, A. 1985b. Growth of disinfection-resistant bacteria and simulation of natural aquatic environments in the chemostat. Water chlorination: Chemistry, environmental impact and health effects. **4**:1137-1147.
- Berman, D.E., Rice, W., and Hoff, J.C. 1988. Inactivation of particle associated coliforms by chlorine and monochloramine. Appl. and Environ. Microbiol. **54**:507-512.
- Blackmer, F., Reynolds, K.A., Gerba, C.P. and Pepper, I.L. 2000. Use of integrated cell-culture pcr to evaluate the effectiveness of poliovirus inactivation by chlorine. Appl. and Environ. Microbiol. **66**(5):2267-2269.
- Boardman, G.D., and Sproul, O.J. 1977. Protection of viruses during disinfection by adsorption to particulate matter. Appl. and Environ. Microbiol. **49**:1857-1862.
- Boulos, L., Prévost, M., Barbeau, B., Coallier, J., Desjardins, R. 1999. LIVE/DEAD® BacLight™: application of a new rapid staining method for direct enumeration of viable and total bacteria in drinking water. Journ. Microbiol. Mthds. **37**:77-86.
- Box, G.E.P., Hunter, W.G. and Hunter, J.S. 1978. Resolution III designs: Bicycle Examples. Statistics For Experimenters. John Wiley and Sons, New York, NY.
- Brazis, A.B., Leslie, J.E., Kabler, P.W. and Woodward, R.L. 1958. The inactivation of spores of *Bacillus globigii* and *Bacillus anthracis* by free available chlorine. J. Appl. Microbiol. **6**:338.
- Butterfield, C.T., Wattie, E., Megregian, S. and Chambers, C.W. 1943. Influence of pH and temperature on the survival of coliforms and enteric pathogens when exposed to free chlorine. Public Health Rep. **58**:1837-1866.
- Chick, H. 1908. An investigation of the Laws of disinfection. Journal of Hygiene, **8**:92-157.
- Clark, R.M., Rice, E.W., Pierce, B.K., Johnson, C.H. and Fox, K.R. 1994. Effect of aggregation on *Vibrio Cholerae* inactivation. J. Environ. Eng. **120**:875-887.

- Corona-Vasquez, B., Rennecker, J.R. and Marinas, B.J. 2000. Inactivation of *Cryptosporidium parvum* oocysts with ozone and free chlorine at low temperature. AWWA Water Quality Technology Conference. Salt Lake City, UT, USA.
- Fair, G.M., Morris, J.C. and Chang, S.L. 1947. The dynamics of water chlorination. J. NEWWA. **61**:285-293.
- Fair, G.M., Morris, J.C., Chang, S.L., Weil, I., and Burden, R.P. 1948. The behavior of chlorine as a water disinfectant. J. Am. Wat. Wks Assoc. **40**(10):1051-1061.
- Faust, S.D. and Aly, O.M. 1998. Chemistry of Water Treatment. 2nd ed. Ann Arbor Press.
- Finch, G.R., Neumann, N., Gyürek, L.L., Bradbury, J., Liyanage, L. and Belosevic, M. 1998. Sequential chemical disinfection for the control of *Giardia* and *Cryptosporidium* in drinking water. AWWA Water Quality Technology Conference. San Diego, CA, USA.
- Finch, G.R. and Choe, K. 1999. Using *Bacillus* spores as surrogate for ozone inactivation of *Cryptosporidium*. Proceedings of the 14th Ozone world Congress. Dearborn, MI, USA.
- Gyürek, L.L., G.R. Finch, and M. Belosevich. 1997. Modeling chlorine inactivation requirements of *Cryptosporidium Parvum*. J. Environ. Technol. **123**(9):865-875.
- Haas, C.N. and Kaymak, B. 2002. Effect of initial concentration on disinfectant efficiency. American Water Works Research Foundation, Report 90867, Denver, CO, USA.
- Haas, C.N., Joffe, J., Anmangandla, U., Jacangelo, J.G. and Heath, M. 1996. Water quality and disinfection kinetics. J. Am. Wat. Wks. Assoc. **88**(3):95-104.
- Herson, D.S., McGonogle, B., Payer, M.A. and Baker, K.H. 1987. Attachment as a factor in the protection of *Enterobacter cloacae* from chlorination. Appl. Environ. Microbiol. **53**:1178-1180.
- Hoff, J.C. and Akin, E.W. 1986. Microbial resistance to disinfectants: mechanisms and significance. Environmental Health Perspective. **60**:7-13.

- Hu, Y., Liu, X. 2003. Chemical composition and surface property of kaolins. *Minerals Engineering*, **16**:1279–1284.
- Langlais, B., Reckhow, D.A. and Brink, D.R.. 1991. *In: Ozone in Water Treatment: Application and Engineering*. American Water Works Association Research Foundation and Lewis publishers inc., Chelsea, MI, USA, 551 p.
- McGrath T.S. and Johnson, J.D. 1979. Microbiological dose as a measure of disinfection. *Water Chlorination: Environmental Impact & Health Effects*. **3**, 687-695.
- LeChevallier, M.W., Evans, T.M., and Seidler, R.J. 1981. Effect of turbidity on chlorination efficiency and bacterial persistence in drinking water. *Appl. Environ. Microbiol.* **42**(1):159-167.
- Morris, J.C. 1966. The Mechanism of the Hydrolysis of Chlorine. *J. Amer. Chem. Soc.* **68**:1692.
- Penrod, S.L., Olson, T.M., Grant, S.B. 1996. Deposition kinetics of two viruses in packed beds of quartz granular media. *Langmuir* **12**, 5576–5587.
- Rennecker, J.L., Driedger, A.J., Rubin, S.A. and Marinas, B. 2000. Synergy in sequential inactivation of *Cryptosporidium parvum* with ozone/free chlorine and ozone/ monochloramine. *Water Research*. **34**(17):4121-4130.
- National Center for Biotechnology Information. 2003.
<http://www3.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Info&id=1423&lvl=3&lin=f&keep=1&srchmode=1&unlock>
- Ridgway, H.F., and Olson, B.H. 1982. . Chlorine resistance patterns of bacteria from two drinking water distribution systems. *Appl. Environ. Microbiol.* **44**(4):972.
- Scarpino, P.V., Berg, G., Chang, S.L., Dahling, D. and Lucas, M. 1972. A comparative study of the inactivation of viruses in water by chlorine. *Water Research*. **6**:959-965.
- Sobsey, M.D. 1989. Inactivation of health related microorganisms in water by disinfection processes. *Wat. Sci. Technol.* **21**(3)179-195.

- Stagg, C.H., Wallis, C. and Ward, C.H. 1977. Inactivation of clay-associated bacteriophage MS-2 by Chlorine. *Appl. Environ. Microbiol.* **33**(2):385-391.
- USEPA. 1999. Alternative Disinfectants and Oxidants Guidance Manual. 815-R-99-014.
- USEPA and USDC. 1989. Guidance Manual for Compliance with Filtration and Disinfection requirements for Public Water Supplies Using Surface Water Sources. NTIS. Springfield, Va.
- Watson, H.E. 1908. A note on the variation of the rate of disinfection with change in the concentration of the disinfectant. *Journal of Hygiene*, **8**:536-542.

CHAPITRE 5

IMPACTS OF WATER QUALITY ON CHLORINE DIOXIDE EFFICACY IN SYNTHETIC WATERS

Ce chapitre présente les résultats d'essai de désinfection visant à établir les effets de la qualité de l'eau sur l'efficacité du bioxyde de chlore. Dans le but d'établir une base de comparaison solide, cette étude a été réalisée à l'aide d'eaux reconstituées au laboratoire. Ce chapitre a fait l'objet d'une publication dans la revue *Journal of Environmental Engineering & Sciences*. Les résultats bruts des essais sont disponibles aux annexes B (spores) et D (virus MS2).

EXAMINATION OF DISCRETE AND COUNFOUNDING EFFECTS OF WATER QUALITY PARAMETERS DURING THE INACTIVATION OF MS2 PHAGES AND *BACILLUS SUBTILIS* SPORES WITH CHLORINE DIOXIDE

Benoit BARBEAU¹*, Debra HUFFMAN², Chandra MYSORE³
Raymond DESJARDINS¹, Bernard CLÉMENT¹ and Michèle PRÉVOST³

- 1 Ecole Polytechnique de Montréal, NSERC Industrial Chair on Drinking Water, Civil Geological and Mining Engineering, CP 6079, Succ. centre-ville, Montréal (Québec), Canada, H3C 3A7
- 2 University of South Florida – College of Marine Science, St Petersburg, FL-33701
- 3 Veolia - North American Technology Center, Norcross, GA-30092

Abstract: The role of water quality (pH, temperature, turbidity and natural organic matter - NOM) on the efficacy of chlorine dioxide to inactivate *B. subtilis* spores and

MS2 phages was investigated in synthetic waters. Modelling the curves describing tailing inactivation with a parallel Chick-Watson model proved to be a valid approach. The formation of aggregates was exacerbated when using chlorine dioxide as opposed to free chlorine. The origin of these aggregates lies in the interactions of chlorine dioxide with the water matrix and the microorganisms. Higher temperature and higher turbidity were dominant factors in predicting spores tailing, while decreasing the pH from 8.5 to 6.5 was responsible for increasing the fraction of MS2 aggregates from 0.06% to 9.0% (138-fold). The resistance of spore aggregates was, on average, 18 times higher than for single spores. MS2 aggregates were 21 times more resistant than single virions. The addition of dissolved organic carbon significantly ($p < 0.01$) improved inactivation with chlorine dioxide. The 1-log CT values for *B. subtilis* spores were lowered from 819 to 326 $\text{mg}\cdot\text{min}\cdot\text{L}^{-1}$ in the presence of 5 mg C/L, while the CT 4 log values for MS2 phages decreased from 0.79 to 0.57 $\text{mg}\cdot\text{min}\cdot\text{L}^{-1}$ in the presence of 2 mg C/L. Turbidity (5NTU) did not significantly hinder MS2 inactivation, but it increased the CT-1 log of *B. subtilis* spores from 386 to 600 $\text{mg}\cdot\text{min}\cdot\text{L}^{-1}$.

Key words: Drinking water, disinfection, spores, MS2 coliphages, chlorine dioxide, water quality, turbidity, natural organic matter

5.1 INTRODUCTION

Research on the use of chlorine dioxide for the disinfection of drinking water began in the 1940s with the pioneering work of Ridenour (1947, 1949). Over the decades, it has been shown that chlorine dioxide has characteristics that made it a promising alternative to free chlorine. Chlorine dioxide does not form trihalomethanes, does not react with ammonia, and is a more potent disinfectant for the inactivation of *Cryptosporidium* and *Giardia* (White 1999). Nevertheless, the shift to chlorine dioxide in the water industry has not been as dominant as one may have anticipated, in part due to the concerns related to the toxicity of chlorite. The concentration of chlorine

dioxide and chlorite are limited to 0.8 mg/L and 1.0 mg/L respectively by the USEPA regulation (1998).

Past research on the impact of water quality on chlorine dioxide efficacy focused mainly on the impacts of pH and temperature. For each 10°C increase in water temperature, the rate of inactivation of chlorine dioxide is multiplied by 2.4-2.7 for *E. coli* (Bernade et al. 1967) or 1.3-1.4 (SDWC et al. 1977), 1.7-3.4 for protozoan cysts (Chen et al. 1985; Ruffell et al. 2000) and 1.2-2.2 for poliovirus 1 (Junli et al. 1997; SDWC et al. 1977). Increasing pH from 6.0 to 9.0 has either no impact or slightly improves ClO₂ efficacy (Bernarde et al. 1965; Scarpino et al. 1979; Chen et al. 1985; Masschelein 1992; Botzenhart 1993; Ruffell et al. 2000).

The role of turbidity and natural organic matter (NOM) on ClO₂ efficacy has never been assessed in a systematic manner in conjunction with the influence of temperature and pH. The overall objective of this research, therefore, was to study the impact of water quality parameters (pH, temperature, turbidity, and NOM) on the inactivation of *B. subtilis* spores and MS2 coliphages by chlorine dioxide. This objective was achieved by performing disinfection assays in batch reactors with various synthetic waters. Inactivation kinetics were modelled and an analysis of variance was conducted on the model parameter estimates in order to discern the discrete and confounding effects of water quality on chlorine dioxide efficacy.

5.2 MATERIALS AND METHODS

5.2.1 Experimental Design

A large number of variables was investigated during this project: 4 water quality variables and 2 microorganisms (MS2 phages and *B. subtilis* spores). A partial factorial experimental design was chosen in order to minimize the number of experiments and improve the robustness of our analysis. A commercially available

statistical software, (StatisticaTM, Statsoft, USA), was used to establish a $\frac{1}{2}$ factorial design based on four control variables (water quality) explored at two levels (high and low predefined values). This design required $2^{4-1} = 2^3 = 8$ assays, cutting the number of experiments in half compared to a full factorial design ($2^4 = 16$ assays). A ninth assay was also added at the mid-range of each variable so as to evaluate the 2nd order (non-linear) interactions. For each microorganism, this partial factorial design was replicated for 2 to 4 initial chlorine dioxide concentrations. The completion of the replicates was spanned over a three-month period (randomly) in order to increase the robustness of the data set.

Table 5-1 presents the general statistical plan that was used for bench-scale assays in synthetic waters to study the inactivation of *Bacillus subtilis* spores or MS2 phages by chlorine dioxide. As shown in Table 5-1, two variables were modified simultaneously from one assay to another. In order to do so, synthetic waters were prepared using ultra-pure waters buffered to pH 6.5 or 8.5, amended with inorganic turbidity (kaolin) up to 5 NTU and/or natural organic matter (Suwannee River NOM-extract) up to 5 mg C/L. In the case of MS2 phage experiments, a maximum DOC concentration of 2 mg C/L had to be used due to the high reactivity of Suwannee River NOM with chlorine dioxide. A detailed description of the water preparation protocol is presented in the following paragraphs.

Tableau 5-1: Description of each disinfection assay condition resulting from the statistical design.

Conditions	pH	Temperature (°C)	Turbidity (NTU)	DOC ¹ (mg C/L)
1	6.5	7	0	0
2	8.5	7	0	2 or 5
3	6.5	22	0	2 or 5
4	8.5	22	0	0
5	6.5	7	5	2 or 5
6	8.5	7	5	0
7	6.5	22	5	0
8	8.5	22	5	2 or 5
9	7.5	14.5	2.5	1 or 2.5
(Centered)				

1: The DOC concentration was set at 2.0 mg C/L for MS2 experiments and 5.0 mg C/L for *B. subtilis* spores experiments. Note: each disinfection condition was replicated 2-4 times using various initial ClO₂ concentrations.

5.2.2 Synthetic Water Preparation

Synthetic waters were prepared using Milli-Q water. A phosphate buffer with an ionic strength of 0.01 M was added to maintain the pH at 6.5, while a borate buffer, also with an ionic strength of 0.01 M, was used to maintain the pH at 8.5. Kaolinite clay (Phipps&Bird, Hydrite R grade) was used to induce turbidity in experimental waters; approximately 5 mg/L was used to create water having a target turbidity of approximately 5 NTU. This turbidity corresponds to a total particle count of roughly 15 000 particles/mL (measured by light obscuration, HACH WPC1900), with roughly 90% being in the 2-5 µm range. This turbidity level was chosen since it represents the maximum allowable turbidity for unfiltered supplies. Kaolinite does not react with chlorine dioxide.

Natural organic matter (NOM) was purchased as a dry powder from the International Humic Substances Society, Golden-Colorado. The elemental

composition of dry Suwannee River NOM was: 48.8 % C; 3.9 % H; 39.7 % O; 1.02 % N; 0.60 % S; 0.02 % P; 7.0 % Ash. A stock solution was prepared by dissolving the NOM in Milli-Q water filtered through a 0.22 μm filter. The stock solution was stored in a carbon-free glass flask at 4°C. NOM was added to experimental reactors after the experimental water had been autoclaved. Initially, a DOC concentration of 5 mg C/L (SUVA = 4.3) was chosen for assays conducted with *B. subtilis* spores. This high DOC concentration was chosen as being representative of a high case scenario for drinking water disinfection. However, this high concentration was found to induce high variability during MS2 experiments due to the difficulty of monitoring ClO_2 decay during the first 120 s, the typical duration of a disinfection assay with MS2. Therefore, the DOC concentration had to be lowered to 2 mg C/L for MS2 assays in order to avoid this difficulty.

The organisms (*Bacillus subtilis* spores at a concentration of $10^{4.5}$ CFU/mL or viruses at $10^{5.0}$ pfu/mL) were added to autoclaved test waters. Assays were performed separately for viruses and spores, in part due to the large difference in sensitivity of the two organisms. The spores or the viruses were added to the experimental waters 24 hours prior to the experiments and left continuously stirring at room temperature. This procedure was done to maximize interactions of microorganisms with the DOC and kaolinite clay added to the experimental waters. Prior to the experiments, batch reactors were placed in a water bath to maintain a constant temperature for the duration of the experiments.

5.2.3 Microorganisms Culturing and Analysis

A culture of *Bacillus subtilis* was purchased from the American Type Culture Collection, ATCC#6633, and a single stock culture was prepared to use in all bench scale inactivation experiments, as described in Barbeau et al. (2004).

For spore enumeration, biological samples were quenched in 1% (w/w) sodium thiosulfate and enumerated using a modified vacuum plate filtration method (Barbeau et al. 1997). This modified plate filtration method used Tryptic Soy Broth (Becton Dickinson, Sparks, MD), including tetrazolium tri-chloride, to improve visualization of the colonies by dyeing the colonies red. After the spores were filtered and placed on a nutrient pad, they were pasteurized in a water bath. The plates were then placed in a 37°C incubator for 24 hours, then counted.

MS2 phages (ATCC # 15597B) were prepared from infected lawns of host *Escherichia coli* (ATCC # 15597), as described in Barbeau et al. (2004). To enumerate MS2 phages, the host bacteria (*E. coli*, ATCC # 15597) were grown to stationary phase in TSB and added to the virus sample and soft agar overlay, mixed and spread on to agar plates. After this had solidified, the plates were inverted and incubated at 37°C overnight. The plaques were enumerated, similar to colony counts for bacteria. If necessary, samples were diluted in PBS and assayed in duplicate. The average plaque-forming unit per mL was calculated. Positive controls were conducted using MS2 stocks with *E. coli*. Negative controls consisted of plating 1.5 mL of host *E. coli* diluted in PBS. An additional negative control was performed by incubating PBS without any host or MS2.

5.2.4 Oxidant Preparation and Analysis

Chlorine dioxide was measured using the ACVK method (Masschelein 1989), which is based on the oxidation and resulting decoloration of Acid Chrome Violet K (Alizarin violet 3R, color index 6170). Decoloration of ACVK was measured using a Spectronic 1001 plus (Milton Roy) spectrophotometer set at 548 nm and 5.0 cm borosilicated glass cells. The blank was prepared by adding 0.250 mL of the reducer sodium sulfite (Fisher Scientific, S447-500) to the sample, whereas 0.250 mL of Milli-Q water (final concentration = 400 mg/L) was added to other cells to afford the same

dilution of the sample. ClO_2 stock solution was prepared according to the chlorite- H_2SO_4 procedure described in Standard Methods (ClO_2 -2500).

5.3 RESULTS

5.3.1 Modeling Inactivation Kinetics

The effective CT (the area under the decay curve at time t) was used to describe the observed inactivation data. For each microbiological observation (N/N_0), the integrated CT is calculated as the area under the disinfectant decay curve at that time. Due to the presence of significant tailing in most of the water conditions tested (5 out of 9 for spores, and 7 out of 9 for phages), an inactivation model was developed to take into account this departure from the standard Chick-Watson kinetics. Figures 5.1 and 5.2 illustrate the spore and phage inactivation data for two of the nine water conditions investigated (conditions 3 and 4, *cf.* Table 5-1).

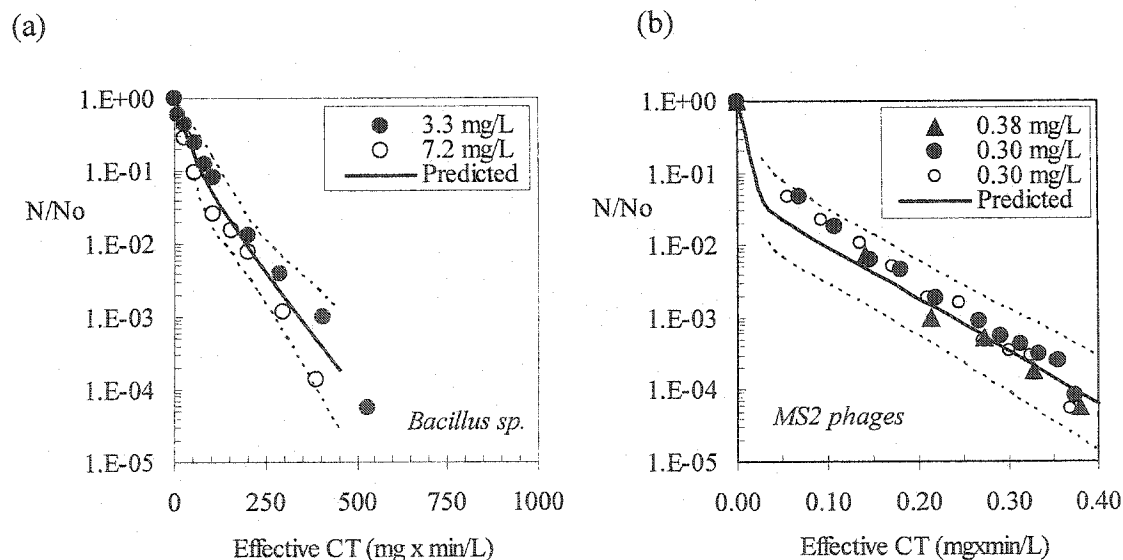


Figure 5-1: Inactivation of (a) *Bacillus subtilis* spores and (b) MS2 coliphages with chlorine dioxide. Condition #3 exhibiting minor tailing: pH 6.5, temperature 22°C, turbidity 0 NTU and DOC 5 mg C/L (spores) or 2 mg C/L (MS2). Numbers

in inset refer to the average ClO_2 residual concentration in mg/L in each replicate test reactors. Line of best fit is the inactivation kinetic provided in Table 5-2 with the usual 95th confidence bands.

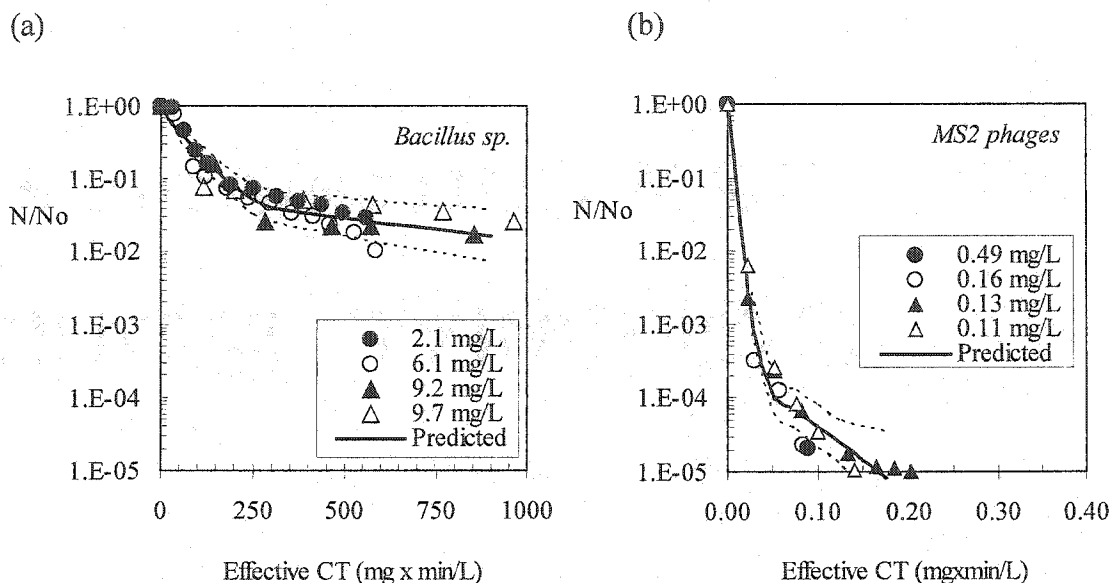


Figure 5-2: Inactivation of (a) *Bacillus subtilis* spores and (b) MS2 coliphages with chlorine dioxide. Condition #4 exhibiting severe tailing: pH 6.5, temperature 22°C, turbidity 0 NTU and DOC 5 mg C/L (spores) or 2 mg C/L (MS2). Numbers in inset refer to the average ClO_2 residual concentration in mg/L in each replicate test reactors. Line of best fit is the inactivation kinetic provided in Table 2 with the usual 95th confidence bands.

Inactivation curves from condition 3 (Fig. 5.1) were not that dissimilar from a Chick-Watson (first-order) kinetic, while condition 4, on the other hand, produced disinfection conditions favourable to severe tailing. Even though the applied ClO_2 concentrations differed amongst replicates, the reproducibility among reactors originating from identical test waters was excellent, as can be observed on Fig. 5.1 and

5.2. This confirms that using the effective CT value as a descriptor of disinfectant dose is adequate.

The issue of tailing was handled by developing a disinfection model based on the simultaneous inactivation of two dominant fractions of the population according to a simple Chick-Watson kinetic. This approach infers that tailing is caused by the presence of aggregated organisms, which exhibit a distinctive resistance pattern to disinfection in comparison to single organisms (Craik et al. 2002). This strategy is deemed superior to the use of a Hom kinetic, which handles tailing behaviour by incorporating an exponent m into the CT concept (C^nT^m).

In our case, the inactivation of *Bacillus subtilis* spores and MS2 phages with chlorine dioxide was modeled using the parallel Chick-Watson equation, as described by Equation 5.1:

$$\text{Log}\left(\frac{N}{N_0}\right) = \text{Log} \left[(1-r) \cdot e^{(-K_s \cdot CT_{\text{effective}})} + r \cdot e^{(-K_A \cdot CT_{\text{effective}})} \right] \quad (\text{Éq. 5.1})$$

Where N/N_0 = the remaining fraction of the spore population

$CT_{\text{effective}}$ = the integrated Ct value: $CT = \int C(t) \cdot dt$

r = the fraction of the population aggregated, with $0 \leq r \leq 1$

K_A = the inactivation rate of the aggregated fraction of the population

K_S = the inactivation rate of the single (un-aggregated) fraction of the population

Equation 5.1 can be reduced to a simple Chick-Watson for $r=1$, $r=0$ or $K_S = K_A$. This model requires fitting three parameters (r , K_A and K_S), which was successively done for all eighteen test waters (9 for spores and 9 for phages) by non-linear estimation using Statistica™ (Statsoft, OK, USA). The results of this work are

summarized in Table 2. The parallel Chick-Watson model efficiently described the tailing behavior, as can be observed in Fig. 5.1 and 5.2. The coefficient of determination (R^2) was always higher than 0.92, and 49 out of 54 parameters estimated were statistically significant at $p=0.05$, an indication that the model was not over-parametrized.

The fraction of aggregated organism (r) was found to vary on a log-scale ($4.7 \text{ E-}04$ - $4.0\text{E-}1$). It will therefore be analyzed as $\log(r)$ in the following section. The value of $\log(r)$ provides an approximate indication of the point at which tailing is observed on the inactivation curve. As an example, tailing is observed on Fig. 5.2b starting at approximately a 4 log inactivation. The value of r was estimated at $3.2\text{E-}04$ or $\log(r) = -3.5$ log (cf. Table 5.2, condition 4).

Tableau 5-2 Inactivation kinetic parameters derived using the parallel Chick-Watson model for *Bacillus subtilis* spores and MS2 coliphages inactivation by chlorine dioxide.

Water	<i>B. subtilis</i> spores					MS2 phages				
Condi- tions	K_S	K_A	r	CT-1log	R^2	K_S	K_A	r	CT-4log	R^2
1	3.33E-03	4.12E-05	0.08	1075	0.98	172	5.7	4.0E-01	1.47	0.92
2	1.08E-02	1.46E-03	0.01	217	0.97	304	13	1.9E-03	0.23	0.98
3	4.26E-02	1.54E-02	0.19	72	0.92	163	17	5.2E-02	0.37	0.94
4	1.86E-02	1.48E-03	0.06	157	0.92	267	21	3.2E-04	0.056	0.99
5	4.74E-03	6.23E-04	0.05	560	0.98	27	5.7	7.3E-02	1.15	0.97
6	6.13E-03	9.47E-04	0.37	1375	0.97	120	11	1.7E-03	1.18	0.98
7	1.04E-01	3.86E-03	0.38	350	0.95	31	6.8	4.9E-02	0.92	0.97
8	2.93E-02	9.65E-03	0.31	134	0.99	223	31	2.0E-04	0.045	0.99
9	1.26E-02	7.75E-04	0.06	233	0.98	50	8.3	2.4E-03	0.39	0.92

Note: Bold values indicate parameters that were not significant at $p=0.05$

K_S and K_A are expressed as $\text{L mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$, while CT are expressed as $\text{mg} \cdot \text{min} \cdot \text{L}^{-1}$

The CT values for 1 log inactivation of *B. subtilis* spores and 4 log inactivation of MS2 phages are also provided in Table 5.2. Quoting a 1 log CT value is not standard practice. This was necessary, however, as we did not reach 2 log spore inactivation for some water conditions due to the presence of tailing, even though effective CT values as high as 5 000 mg•min•L⁻¹ were reached. It is also noteworthy to mention that *B. subtilis* spores were typically 1 000 to 10 000 times more resistant to ClO₂ than MS2 phages.

5.3.2 Effect of Water Quality on the Inactivation Kinetics Parameters

The role of water quality on inactivation kinetic parameters was assessed in two ways. First, an analysis of variance was performed in order to make a general assessment of which water quality variables were the most influential in explaining the observed variations of the following dependent variables: Ct values, K_S, K_A, and log(*r*). Secondly, a detailed evaluation was carried out to quantify the effects of pH, temperature, turbidity, and DOC on kinetic parameters.

5.3.3 Analysis of Variance (ANOVA)

This statistical approach identified the main parameters affecting the output variable under investigation, K_S, K_A, log(*r*), and CT values, through a sensitivity analysis. For each variable, a mathematical model (Eq. 2) calculates its relative importance in affecting the process under study.

$$Y(\text{output}) = \beta_0 + \sum_{j=1}^4 \beta_j x_j + \sum_{k=1}^3 \beta_k x_k + \text{error} \quad (\text{Eq. 5.2})$$

This model describes the output variable, Y (K_S, for example), affected by the various process control variables (*x_j*) - pH, temperature, DOC, and turbidity. The *x_k* variables represent the second-order interactions of the control variables *x_j***x_j*, (*j j'*). The β_j and β_k coefficients are the fitting parameters calculated by the software (Statistica™) from results accumulated during the laboratory experiments.

Tables 5.3 and 5.4 provide the results of the ANOVA for *B. subtilis* spores and MS2 phages, respectively. Results are expressed in terms of the contribution of water quality variables (as a percentage) in explaining the variability of kinetic parameters and CT values. For *B. subtilis* spores, the process of inactivation (CT-1 log, K_S , K_A) was mostly controlled by water temperature; this variable accounted for 40-44% of the variability. The second most influential variable was dissolved organic carbon (DOC), which accounted for 24-27% of the variability of the inactivation of aggregated spores and the CT-1log values. DOC was, however, a minor contributor (3%) to the inactivation of single spores (K_S). As for aggregation ($\log r$), turbidity (30%), temperature (22%), and DOC (12%), they were all strong factors in explaining the variation of $\log r$. Interestingly, pH (which impacts zeta potential) was a minor factor.

Tableau 5-3: Sensitivity analysis: Percentages of explanation of the control variables (water quality) on various dependent variables (K_S , K_A , $\log r$, Ct-1 Log values) for *Bacillus subtilis* spores.

Control variables	Dependent variables			
	$K_S^{\#}$	$K_A^{\&}$	$\log r^*$	CT-1log
Temperature	40%	42%	22%	44%
pH	11%	2.3%	3.1%	0.3%
Turbidity	6.8%	0.6%	30%	5.1%
DOC	3.0%	24%	12%	27.2%
Interactions	31%	30%	29%	17.4%
Unexplained variance	7.8%	0.6%	3.2%	5.7%
Total	~100%	~100%	~100%	~100%

$\#$: Rate of inactivation of single organisms

$\&$: Rate of inactivation of aggregated organisms

$*$: Log of the ratio of aggregated organisms

Bold values indicates effects not significant at $p = 0.05$

Tableau 5-4: Sensitivity analysis: Percentages of explanation of the selected control variables (water quality) on various dependent variables (K_S , K_A , $\text{Log}(r)$, Ct-4 Log values) for MS2 phages.

Control variables	Dependent variables			
	$K_S^{\#}$	$K_A^{\&}$	$\text{Log } r^*$	CT-4log
Temperature	1%	35%	8%	17%
pH	26%	35%	85%	64%
Turbidity	32%	0.1%	1.3%	0.3%
DOC	3%	10%	0.8%	4.7%
Interactions	15%	17%	3.1%	10.6%
Unexplained variance	23%	3.5%	1.8%	2.6%
Total	~100%	~100%	~100%	~100%

$\#$: Rate of inactivation of single organisms

$\&$: Rate of inactivation of aggregated organisms

$*$: Log of the ratio of aggregated organisms

Bold values indicates effects not significant at $p = 0.05$

In contrast to spores, the relative impact of water quality on the inactivation of single MS2 virions (K_S) was very different than for aggregated MS2 (K_A) or CT-4 log values. The latter were mostly dominated by temperature (17-35%), pH (35-64%), and DOC (5-17%), while the former was essentially dictated by pH (26%) and turbidity (32%). The total percentage of variance explained was only 77% for the parameter K_S , while percentages were higher than 94% for all other ANOVA completed. The value of K_S describes the rate of inactivation for the pre-tailing portion of the inactivation curve. In the case of MS2 phages, this portion of the curve occurs typically before an effective CT of $0.05 \text{ mg}\cdot\text{min}\cdot\text{L}^{-1}$. Experimental data points are scarce in this area, which contributes to greater uncertainty on the evaluation of K_S and, in turn, poorer ANOVA results.

The most important difference between ANOVAs of *B. subtilis* and MS2 phages is the important role of pH on MS2 inactivation, as it was very small for spores. The explanation for such a difference can be traced back to the role of water quality on the aggregation of MS2 phages (represented by $\log r$). The presence of tailing in MS2 inactivation data was essentially controlled by pH, which explained as much as 85% of the variability of $\log r$ values. As the presence of tailing increases the apparent resistance of microorganisms to disinfection, the impact of pH strongly influenced the CT 4 log values required to inactivate MS2 phages.

5.3.4 Evaluation of Quantitative Impacts of Water Quality on Disinfection Kinetics

The ANOVA provided us with an overview of the most influential variables impacting ClO_2 disinfection kinetics. However, it is of interest to assess whether or not these impacts are favorable to disinfection, and to what extent they will quantitatively influence this process. Such an analysis will be conducted using marginal means, a method by which the average effect of each four water quality variables can be isolated individually.

Figure 5.3 summarizes the impacts of water quality on the fraction of aggregated organisms (r). The effect of pH on MS2 was the most pronounced (Fig. 5.3a). Reducing pH from 8.5 to 6.5 led to a 125-fold increase (2.1 log) of this parameter. An increase in the aggregated fraction was also observed for spores (1.6-fold or 0.2 log), although it was minor compared to phages. Water temperature also had a significant impact on the parameter r (Fig. 5.3b). Higher water temperature favored aggregation of spores, while it inhibited aggregation of MS2 phages. The role of DOC (Fig. 5.3c) was either not statistically significant (MS2) or negligible (spores). Finally, increasing turbidity from 0 to 5 NTU promoted aggregation of spores. The value of r rose from 4.5% to 21%. For MS2 phages, surprisingly, the opposite was observed; the value of r was reduced from 1.0% to 0.56% ($p < 0.01$).

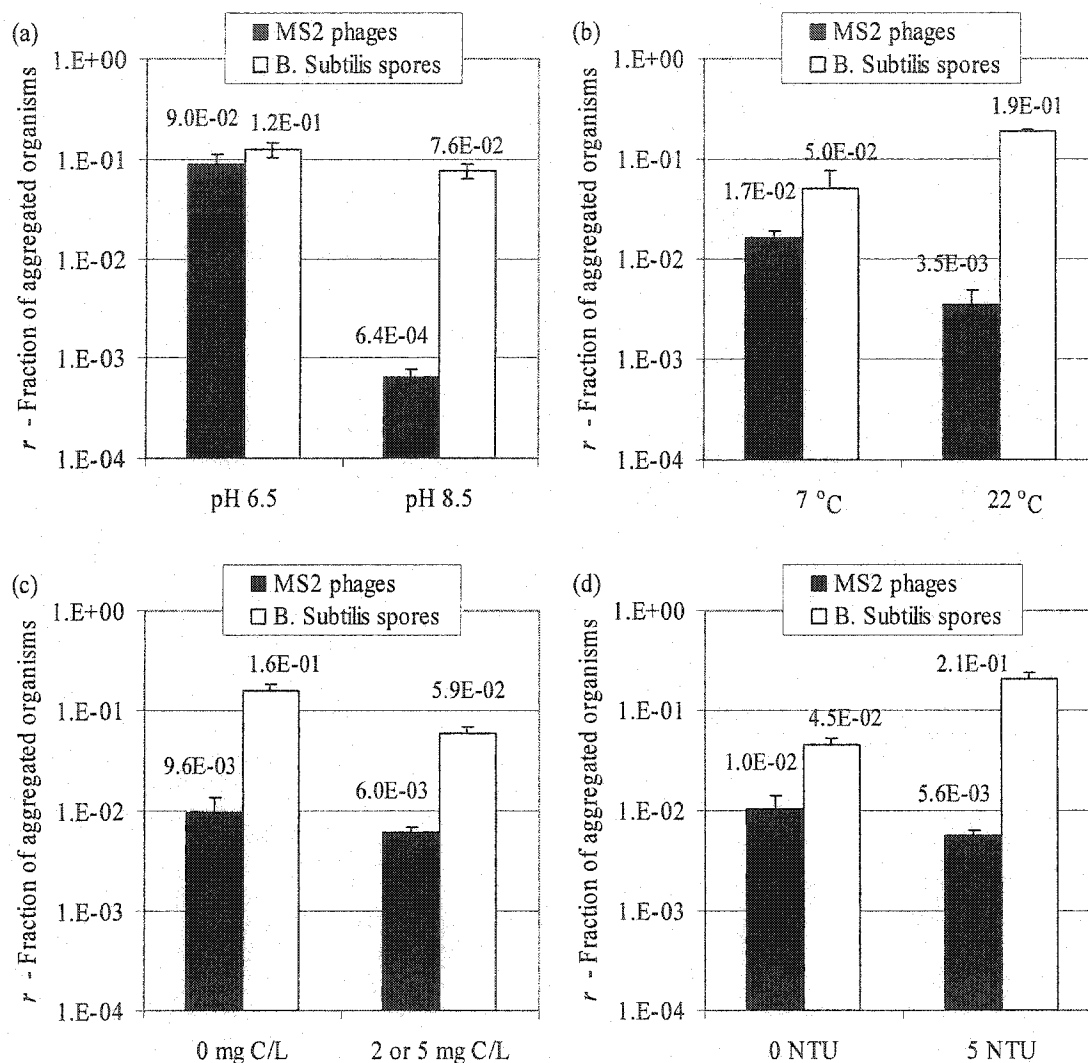


Figure 5-3: Influence of pH (a), temperature (b), DOC (c) and turbidity (d) on the model parameter r describing the fraction of aggregated organisms. Error bars represent the 95th confidence interval.

Figure 5.4 presents the marginal effects of pH on the rate of inactivation of single (K_S) and aggregated (K_A) organisms. For *B. subtilis* spores (Fig. 5.4a), the rate of

inactivation of single organisms increased with higher pH, while the opposite was true for the inactivation rate of aggregated organisms. In general, these antagonistic effects neutralized the effect of pH on the CT 1 log value, which did not vary significantly with pH (cf. Table 5.3). In the case of MS2, increasing pH from 6.5 to 8.5 roughly doubles the rate of inactivation of both single and aggregated organisms.

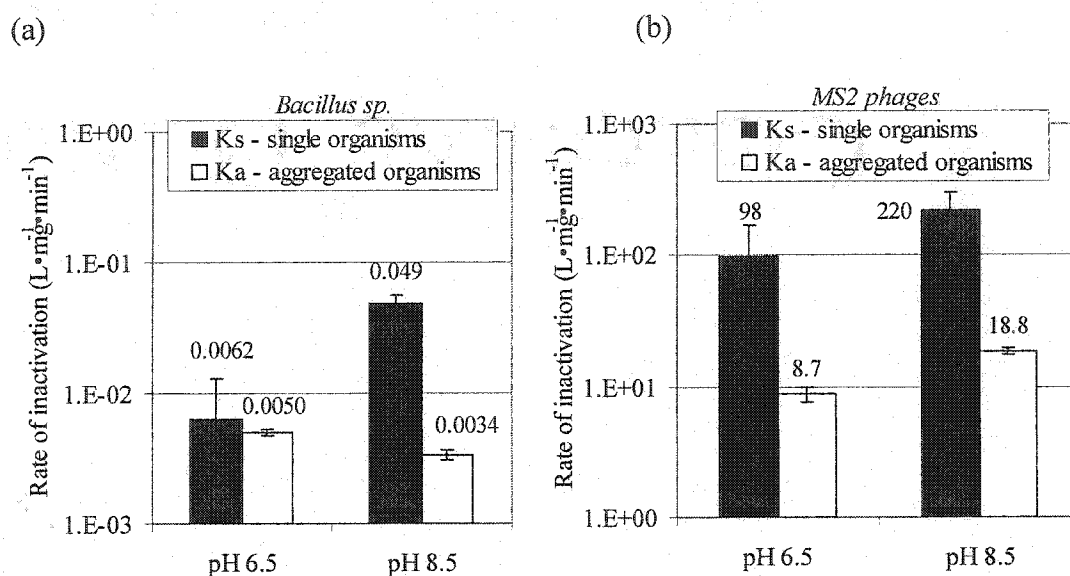


Figure 5-4: Influence of pH on *B. subtilis* spores (a) and MS2 phages inactivation of single organisms (K_s) and aggregated organisms (K_a). Error bars represent the 95th confidence interval.

Figure 5.5 illustrates the role of temperature on the rate of inactivation of *B. subtilis* spores (Fig. 5.5a) and MS2 phages (Fig. 5.5b). As could be expected, an increase of temperature from 7°C to 22°C always favoured an increase in the rate of inactivation. In the case of *B. subtilis*, the effect was considerable: approximately a 9-fold increase for both rates of inactivation. For MS2, the effects on single (K_s) and aggregated organisms (K_a) were 1.2-fold ($p > 0.05$) and 2.1-fold, respectively.

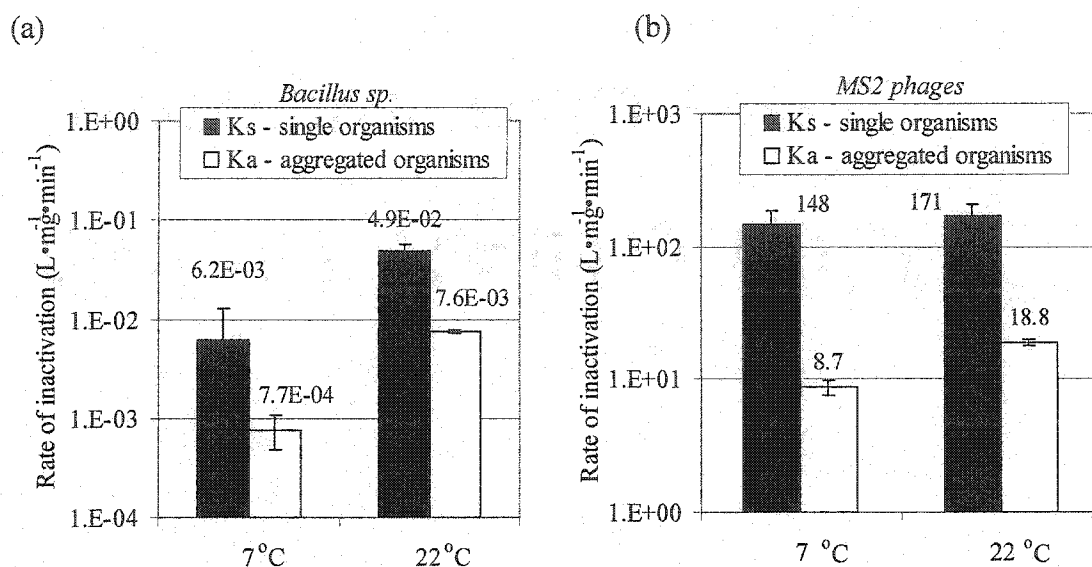


Figure 5-5: Influence of temperature on *B. subtilis* spores (a) and MS2 phages inactivation of single organisms (K_s) and aggregated organisms (K_a). Error bars represent the 95th confidence interval.

The influence of DOC on the rate of inactivation of *B. subtilis* spores and MS2 phages is presented in Figure 5.6. Interestingly, the presence of DOC was beneficial to the inactivation of both organisms. However, this influence was essentially observed on the rate of inactivation of aggregated organisms, which increased 1.5-fold ($p < 0.01$) and 4.3-fold ($p < 0.01$), for MS2 phages and *B. subtilis* spores, respectively.

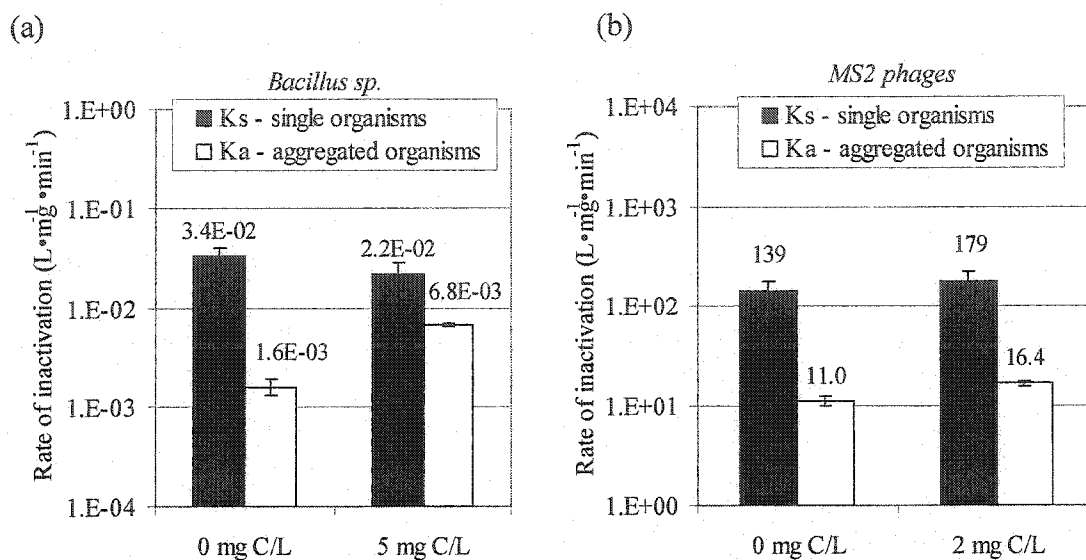


Figure 5-6: Influence of dissolved organic carbon concentrations on *B. subtilis* spores (a) and MS2 phages inactivation of single organisms (K_S) and aggregated organisms (K_A). Error bars represent the 95th confidence interval.

The influence of turbidity, the last water quality variable evaluated, is presented in Figure 5.7. In general, the influence of turbidity (induced by the addition of kaolin particles) was the least important among the four water quality variables under investigation. The highest observed marginal effects were for the inactivation rate of single MS2 virions, which decreased from 227 to 92 $L \cdot mg^{-1} \cdot min^{-1}$ or 2.5-fold.

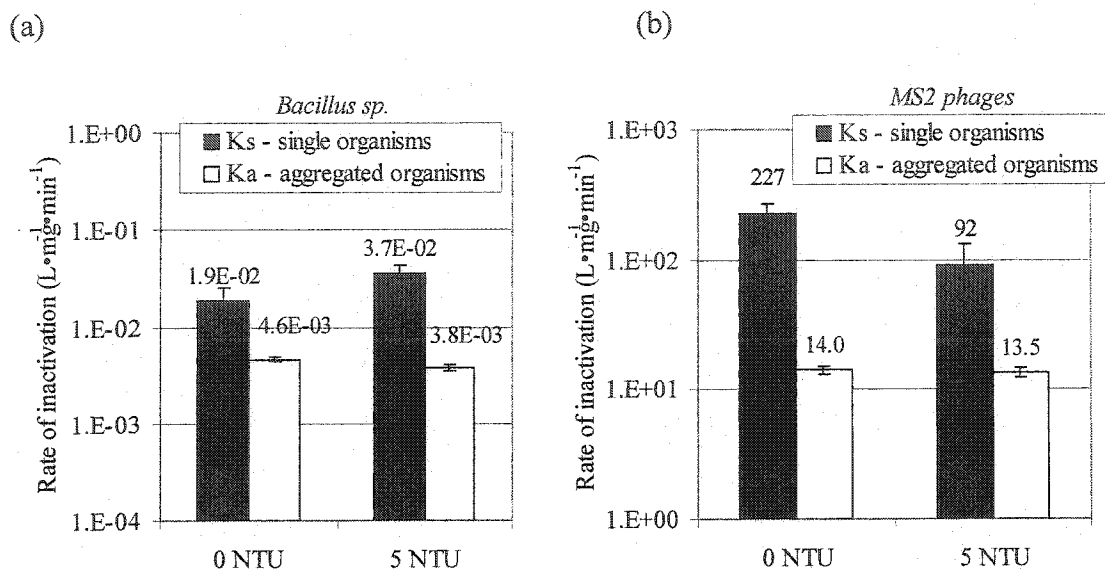


Figure 5-7: Influence of turbidity (induced using kaolin) on *B. subtilis* spores (a) and MS2 phages inactivation of single organisms (K_s) and aggregated organisms (K_A). Error bars represent the 95th confidence interval.

5.4 DISCUSSION

Achieving a high level of inactivation during water treatment is the main goal of design engineers. However, for inactivation levels beyond 4 log, rare events (such as aggregates) or slight hydraulic backmixing in full-scale contactors may become the controlling factors to predict the overall performance of the disinfection process. This concept is not fully understood by those who rely on the CT_{10} value for design. The CT_{10} assumes that the inactivation level can always be doubled as long as the microbiological dose (CT_{10}) is doubled, a statement that can only be true in the absence of tailing.

The presence of tailing during disinfection is a well known phenomenon that has been attributed (Cerf 1977) to (i) variations in resistance between species (e.g. HPC.), (ii) variations in resistance among the same species (due to genetic differences) or,

more commonly, (iii) the presence of a small sub-population of aggregated organisms. In this project, aggregation was the cause of tailing. The presence of spore aggregates was confirmed microscopically for the worst tailing observed during this project: condition #1 (pH 6.5, T 7°C, no DOC or turbidity). Out of more than 500 events counted, 9.4% were aggregates. The best-fit value of r , derived from the parallel Chick-Watson model, was 7.8% \pm 0.7%, a value consistent with the microscopic analysis.

Traditionally, tailing has been modelled by the use of the Hom model. Yet, this model is not mechanistic in nature. The inclusion of the parameter m is only a mathematical artifice providing an improved fit. The use of a parallel Chick-Watson (CW) model, such as the one used for this study, offers the advantage of useful kinetic information. It can also be generalized to account for lag phase by using the multitarget model, as described by Craik et al. (2002) who adequately described *B. subtilis* spore ozone inactivation using this model. Although the parallel CW model is deemed superior to the Hom model, it must be viewed as a simplification of the disinfection process. It assumes only two populations, aggregated vs non aggregated, while resistance to disinfection is most likely a function of the size of the aggregates. During our microscopic analysis, aggregates of various sizes were observed. Nevertheless, this model provided a very good fit to various conditions (microorganisms and water conditions). It also permits the use of the effective CT concept, which greatly simplifies the analysis of disinfection data set compared to the Hom CT values (C^nT^m).

The resistance of spore aggregates were, on average, 18 times (3 – 81) higher than for single spores. For their part, MS2 aggregates were 21 times (5 – 92) more resistant than single virions. Craik et al. (2002), using an equivalent modelling approach, provided rate constants which are 12.7 times higher for agglomerated spores than for individual spores of *B. subtilis* (2.4 vs 0.18 L mg⁻¹ min⁻¹). Other studies indicate that

viral/bacterial aggregates are typically 4 to >10 times more resistant than individual organisms (Galasso and Sharp 1965; Sharp et al. 1976; Clark et al. 1994; Grant et al., 1995). We have also studied impacts of water quality on free chlorine efficacy using a rigorously identical protocol (test organisms and water quality conditions). Surprisingly, no tailing was observed in the inactivation curves (Barbeau et al. 2004). It was confirmed that the formation of aggregates is dependent on the interactions of the disinfectant with the water matrix, and not solely the water quality conditions. The spores initially injected into the test waters were free of aggregates (less than 0.2% or 1 event for 500 spores counted by DIC microscopy). These organisms were agitated for 24 h at room temperature in order to promote interactions with the test water. This agitation increased the degree of aggregation to 3.6% for the spores in contact with test water #1. However, the level of aggregation at the end of the disinfection assay (15 hr) was very high, not as much in terms of the percentage of aggregation, which rose to 9.4%, but rather in terms of the average size of aggregates, which increased from 43 μm^2 to 188 μm^2 . Clearly, chlorine dioxide is capable of promoting the formation of viral and spore aggregates through particle destabilisation, a phenomenon that has been extensively studied in the case of ozone (Edwards and Benjamin 1991; Chandrakanth and Amy 1998).

The role of inorganic turbidity on ClO_2 efficacy was a secondary parameter for MS2 phage inactivation. Increasing turbidity from 0 to 5 NTU had no statistical impact, increasing the CT-4 log value from 0.53 to 0.59 $\text{mg}\cdot\text{min}\cdot\text{L}^{-1}$. This situation is probably due to the fact that kaolin particles and MS2 phages did not interact, which was confirmed since turbidity had no impact on tailing. *B. subtilis* spores did interact with the kaolin particles. Turbidity (along with temperature) was the dominant factor in explaining the presence of tailing. This interaction contributed to the increase in the CT-1 log value from 386 to 600 $\text{mg}\cdot\text{min}\cdot\text{L}^{-1}$. Such an effect is consistent with the works of Scarpino et al. (1972) and Stagg et al. (1977) on the protective effect of kaolin on chlorine efficacy against viruses. Kaolin can provide a moderate (roughly 2-

fold) protective effect on disinfectants. Scarpino et al. (1977) also studied the effect of bentonite on virus disinfection. A turbidity level of 2.3 NTU offered no protection to poliovirus 1, while turbidities of 3.2 and 14.1 NTU did provide some level of protection.

The influence of pH on chlorine dioxide efficacy has not been fully resolved to this day. Although it is generally accepted that pH has a minor influence on chlorine dioxide efficacy, the scientific literature describing an improved efficacy of ClO_2 at a pH above 8 is abundant (Bernarde et al. 1965; Scarpino et al. 1979; Chen et al. 1985; Masschelein, 1992; Botzenhart 1993; Ruffell et al. 2000, Radziminski et al. 2002). In this current project, higher inactivation rates were also observed at pH 8.5 rather than at pH 6.5. The pH effect was especially important for MS2 phage inactivation. Considering that the chlorine dioxide chemical entity remains unaffected (as dissolved gas) in the pH 6.5-8.5 range, it is possible that some reactions leading to inactivation are catalyzed by hydroxide ions, as suggested by Ruffell et al. (2000). Considering the large spectra of organisms (viruses, bacteria, and protozoan cysts) for which this pH effect has been demonstrated, a hypothesis based on water quality interactions appears more plausible than the other classic hypothesis (Chen et al. 1985), which suggests an increased cyst and/or bacterial cell permeability to chlorine dioxide at a higher pH. The influence of water quality is further reinforced by the findings of Radziminski et al. 2002. They observed that the inactivation of *B. subtilis* spores (ATCC19659) was influenced by pH in laboratory waters but not in Ottawa River filtered water.

The beneficial effect of dissolved organic carbon on chlorine dioxide efficacy was somewhat surprising. Its effect was especially considerable for *B. subtilis* inactivation. For example, the CT-1 log values were reduced from $740 \pm 38 \text{ mg}\cdot\text{min}\cdot\text{L}^{-1}$ to $247 \pm 38 \text{ mg}\cdot\text{min}\cdot\text{L}^{-1}$ when DOC was raised from 0 to 5 mg C/L. Interestingly, a moderate favourable impact of DOC (28% reduction of CT-2log values) had also been observed while inactivating these spores with free chlorine (Barbeau et al. 2004). The exact

cause of such phenomenon has not been identified at this time. We propose that ClO_2 reacts with NOM to promote the formation of some chemical entities, providing an additional level of inactivation. These by-products are not chlorite or chlorate, as both were tested and were found to have no significant biocidal efficacy. Recently, Cho et al. (2003) demonstrated that free radicals initiated by the reaction of NOM with ozone enhanced *B. subtilis* spore inactivation. In our case, however, it remains doubtful that free radicals ($\text{OH}\bullet$) are present in the system that was investigated.

Our final remarks will compare results using free chlorine obtained under an identical test protocol (Barbeau et al. 2004). In general, the most influential variable of the two studies was the effect of pH on free chlorine. Variations in the inactivation rate of *B. subtilis* spores and MS2 phages with free chlorine (as measured by an ANOVA) were explained at 89% and 95%, respectively, by two water quality variables: pH and temperature (Barbeau et al. 2004). More than 87% of the chlorine dioxide CT-4 log values for MS2 phages was also explained by pH and temperature. However, in this case, increasing the pH to 8.5 was favourable to inactivation (as opposed to free chlorine) as a result of a combination of two factors: (i) improved efficacy of ClO_2 at pH 8.5 and (ii) lower aggregation of MS2 phages at pH 8.5. As for *B. subtilis* spores, their inactivation by ClO_2 was controlled at 85% by two major variables: temperature and DOC, while pH had a minimal effect. The impact of water quality on disinfection efficacy is not only disinfectant-specific, but will also depend on the microorganisms involved and the interactions of the disinfectant and the organisms with the water matrix.

Another striking difference between results from ClO_2 and Cl_2 assays relates to the absence of an initial lag phase in the inactivation of *B. subtilis* spores with chlorine dioxide. Under identical test conditions, *B. subtilis* spore inactivation curves exhibited a significant lag phase when disinfected with chlorine or ozone (Mysore et al. 2003). Similarly, *Cryptosporidium* inactivation curves with ClO_2 offered no or minimal lag

phase (LeChevallier et al. 1996; Ruffell et al. 2000) while significant lag phases are observed using ozone (Rennecker et al. 1999). Generally, the absence/presence of a lag phase for *Cryptosporidium* has been attributed to variability in the batches of organisms. In the case of *B. subtilis* spores, one single batch was used throughout this project for free chlorine and chlorine dioxide assays. It is therefore presumed that mechanistic differences in the mode of action of ClO_2 vs ozone and free chlorine are causing this difference of behaviour. Similarly to a *Cryptosporidium* cyst wall, spores are protected by a spore coat, which explains their high resistance to chemical disinfectants (Bloomfield and Arthur, 1994). The absence of a lag phase suggests (i) a higher permeability of chlorine dioxide through the spore's coat, compared to ozone or free chlorine and/or (ii) a lower reactivity of ClO_2 with the spore's coat constituents, which would then permit ClO_2 to focus its attack on more vulnerable components of the spores. Young and Setlow (2003) recently demonstrated that inactivation by hypochlorite appears to render spores defective in germination. However, although chlorine dioxide-killed spores were able to initiate the first steps in spore germination, these spores were not able to fully germinate, probably because of some type of membrane damage (Young and Setlow 2003). Clearly, the mechanisms of spore inactivation by chlorine dioxide appear to differ from those of hypochlorites.

5.5 CONCLUSIONS

The role of water quality (pH, temperature, turbidity and natural organic matter) in the efficacy of chlorine dioxide in inactivating *B. subtilis* spores and MS2 phages was investigated in synthetic waters. A statistical experimental design (half-factorial design) was used in order to reduce the number of assays and evaluate interactions between water quality variables. Disinfection efficacy was described using a parallel Chick-Watson model, which accounts for tailing and describes the microbiological dose as the area under the disinfectant decay curve.

The following conclusions can be drawn from this study:

- Modelling tailing inactivation curves with a parallel Chick-Watson model proved to be an adequate methodology. A statistical analysis of model parameters provided useful information that allowed a better understanding of the mechanistic influence of water quality variables on chlorine dioxide efficacy.
- The formation of aggregates was exacerbated while using chlorine dioxide compared to using free chlorine. The origin of these aggregates lies in the interactions of chlorine dioxide with the water matrix and the microorganisms. Higher temperature and higher turbidity were dominant factors in predicting spores tailing, while decreasing the pH from 8.5 to 6.5 was responsible for increasing the fraction of MS2 aggregates from 0.06% to 9.0% (138-fold).
- The resistance of spore aggregates was, on average, 18 times (3 –81) higher than for single spores. For their part, MS2 aggregates were 21 times (5 –92) more resistant than single virions.
- The addition of dissolved organic carbon (Suwannee River NOM-extract) significantly ($p < 0.01$) improved inactivation with chlorine dioxide. The 1-log CT values for *B. subtilis* spores were reduced from 819 to 326 mg•min•L⁻¹ in the presence of 5 mg C/L, while the CT 4 log values for MS2 phages were reduced from 0.79 to 0.57 mg•min•L⁻¹ in the presence of 2 mg C/L.
- Turbidity (5 NTU) did not significantly hinder MS2 inactivation, while it increased the CT-1 log of *B. subtilis* spores from 386 to 600 mg•min•L⁻¹.
- The impact of water quality on disinfection is not only linked to the disinfectant used, but also to the type of microorganisms targeted and the interactions of the disinfectant and the organisms with the water matrix.

Considering the large number of variables at play in the disinfection process, it is reasonable to conclude that inactivation of microorganisms in natural waters is an area where comprehensive studies are still needed. Most of the published scientific

literature on disinfection emphasized avoiding the presence of aggregates in their system, although this is probably the main factor controlling the attainment of a high level of inactivation through disinfection. Additional attention should be given to understanding the occurrence and inactivation of microbial aggregates, considering the increased resistance afforded by this mechanism.

Acknowledgements: This study was funded by the American Water Works Research Foundation and the NSERC-Industrial Chair on Drinking Water at the École Polytechnique de Montréal. The Chair is funded jointly by the City of Montreal, John-Meunier/USFilter/Veolia, the City of Laval, Triax Consultants and the National Science and Engineering Research Council. We also wish to thank Mélanie Rivard, Pascal Lesage, and Julie Phillibert for their valuable technical assistance in the completion of the bench-scale assays.

5.6 REFERENCES

- Ahimou, F., Paquot, M., Jacques, P., Thonart, P. and Rouxhet, P.G. 2001. Influence of electrical properties on the evaluation of the surface hydrophobicity of *Bacillus subtilis*. J. Microbiol. Methods. **45**:119-126.
- Barbeau, B., Huffman, D.E., Mysore, C., Desjardins, R. and Prévost, M. 2004. Examination of discrete and confounding effects of water quality parameters during the inactivation of MS2 phages and *Bacillus subtilis* spores with free chlorine. J. Environ. Eng. Sci. *In press*.
- Bernarde, M.A., Israel, B.M., Oliveri, V.P. and Granstrom, M.L. 1965. Efficiency of chlorine dioxide as bactericide. Appl. Microbiol. **13**:776-780.
- Bernarde, M.A., Snow, B.W., Oliveri, V.P., and Davidson, B. 1967. Kinetics and mechanisms of bacterial disinfection by chlorine dioxide. Appl. Microbiol. **15**:257-265.

- Bloomfield, S.F. and Arthur, M. 1994. Mechanisms of inactivation and resistance of spores to chemical biocides. J. Appl. Bact. Symposium Supplement. 76:91S-104S.
- Botzenhart, K., Tarcson, G.M. and Ostruschka, M. 1993. Inactivation of bacteria and coliphages by ozone and chlorine dioxide in a continuous flow reactor. Wat. Sci. Technol. 27(3-4):363-370.
- Cerf, O. 1977. A review: tailing of survival curves of bacterial spores. J. Appl. Bacteriol. 42:1-19.
- Chandrakanth, M.S. and Amy G.L. 1988. Effects of NOM source variations and calcium complexation capacity on ozone-induced particle destabilization. Water Research. 32(1):115-124.
- Chen, Y.S.R., O.J. Sproul, and Rubin, A.J. 1985. Inactivation of *Naegleria gruberi* cysts by chlorine dioxide. Water Research. 19(6):783-789.
- Craik, S.A., Smith, D.W., Belosevic, M. and Chandrakanth, M. 2002. Use of *Bacillus subtilis* as a model micro-organisms for ozonation of *Cryptosporidium parvum* in drinking water. 1:173-186.
- Cho, M., Chung, H. and Yoon, J. 2003. Disinfection of water containing natural organic matter by using ozone-initiated radical reactions. Appl. Environ. Microbiol. 69(4):2284-2291.
- Edwards, M. and Benjamin, M.M. 1991. Mechanistic study of ozone-induced particle destabilization. J. Am. Wat. Wks. Assoc. 83(6):96-105.
- Galasso, G.J. and Sharp, D.G. 1965. Effect of particle aggregation on the survival of irradiated vaccinia virus. J. Bacteriol. 90(4):1138-1143.
- Hu, Y. and Liu, X. 2003. Chemical composition and surface property of kaolins. Minerals Engineering. 16:1279-1284.
- Hom, L.W. 1972. Kinetics of chlorine disinfection in an ecosystem. ASCE - J. Sanit. Eng. Div. 98(SA1):183-194.

- LeChevallier, M.W., Arora, H., Battigelli, D. and Abbaszadegan, M. 1996. Chlorine dioxide for control of *Cryptosporidium* and disinfection by-products. Proceedings of the Water Quality Technology Conference – AWWA, Boston, MA, USA.
- Junli, H., Wang, L., Nenqi, R., Li, L.X., Fun, S.R. and Yang, G. 1997. Disinfection effect of chlorine dioxide on viruses, algae and animal planktons. *Water Research*. **31**(3):455-460.
- Masschelein, W.J. 1989. Determination of residual ozone or chlorine dioxide in water with ACVK – an Updated Version. *Ozone Sci. Eng.* **11**:209-215.
- Masschelein, W.J. 1992. Unit Processes in Drinking Water Treatment. Marcel Dekker Inc. New York, USA.
- Mysore, C., Lepar, J., Barbeau, B., Amy, G., Hernandez, M., Dow, S., Huffman, D. and Marinas, B. 2003. Impact of water quality on the inactivation of bacterial and viral pathogens. Report 90972F, American Water Works Association Research Foundation, Denver, CO, USA.
- Radziminski, C., Ballantyne, L., Hodson, J., Creason, R; Andrews, R.C., Chauret, C. 2002. Disinfection of *Bacillus subtilis* spores with chlorine dioxide: A bench-scale and pilot-scale study. *Water Research*. **36**(6):1629-1639.
- Rennecker, J. L., B. Marinas, J.H. Owens, and Rice, E.W. 1999. Inactivation of *Cryptosporidium parvum* oocysts with ozone. *Water Research*. **33**:2481-2488.
- Ridenour, G.M. and Ingols, R.S. 1947. Bactericidal properties of chlorine dioxide. *J. Am. Wat. Wks. Ass.* **39**:561.
- Ridenour, G.M. and Armbruster, E.H. 1949. Bactericidal effect of chlorine dioxide. *J. Am. Wat. Wks. Ass.* **41**:537-550.
- Ruffell, K.M., Rennecker, J.L. and Marinas, B.J. 2000. Inactivation of *Cryptosporidium Parvum* with chlorine dioxide. *Water Research*. **34**(3):838-876.

- Safe Drinking Water Committee, Board on Toxicology and Environmental Health Hazards, Assembly of Life Sciences, National Research Council. 1977. Drinking water and health. National Academy Press, Washington D.C.
- Scarpino, P.V., Brigano, F.A.O., Cronier, S. and Zink, M. 1979. Effect of particulates on disinfection of *Enteroviruses* in water by chloramines. USEPA-600/2-79-054, US Environmental Protection Agency, OH, USA.
- Scarpino, P.V. and Hoff J.C. 1984. Effect of particulates on disinfection of *Enteroviruses* in water by chloramines. USEPA-600-84-094, US Environmental Protection Agency, OH, USA.
- Sharp, D.G., Floyd, R. and Johnson, J.D. 1976. Initial fast reaction of bromine on *reovirus* in turbulent flowing water. Appl. Environ. Microbiol. **31**(2):173-181.
- USEPA. 1998. Stage 1 Disinfectants and Disinfection Byproducts Rule <http://www.epa.gov/safewater/mdbp/dbpfr.html>
- Young, S.B. and Setlow, P. 2003. Mechanisms of killing of *Bacillus subtilis* spores by hypochlorite and chlorine dioxide. J. App. Microbiol. **95**(1):54.
- White, G.C. 1999. Handbook of Chlorination and Alternative Disinfectants. 4th edition, John Wiley & Sons, Indianapolis, OH, USA.

CHAPITRE 6

IMPACTS OF WATER QUALITY ON CHLORINE AND CHLORINE DIOXIDE EFFICACY IN NATURAL WATERS

Ce chapitre présente les résultats d'essai de désinfection visant à établir les effets de la qualité de l'eau sur l'efficacité du chlore et du bioxyde de chlore. Cette étude a été réalisée à l'aide d'eaux naturelles, ce qui permet des comparaisons directes avec les résultats obtenus en eaux synthétiques aux chapitres précédents. Ce chapitre a fait l'objet d'une publication dans la revue *Water Research*.

IMPACTS OF WATER QUALITY ON CHLORINE AND CHLORINE DIOXIDE EFFICACY IN NATURAL WATERS

Benoit BARBEAU^{1*}, Raymond DESJARDINS¹,
Chandra MYSORE², Bernard CLÉMENT³ and Michele PRÉVOST²

- 1 Ecole Polytechnique de Montréal, NSERC Industrial Chair on Drinking Water,
Civil Geological and Mining Engineering, CP 6079, Succ. Centre-ville, Montréal
(Québec), Canada, H3C 3A7
- 2 Veolia - North American Technology Center, Norcross, GA-30092
- 3 Ecole Polytechnique de Montréal, Department of Applied Mathematics and
Industrial Engineering

*: Corresponding author: 514(340)4711 (ext. 2988)

e-mail: benoit.barbeau@polymtl.ca

Abstract: The impact of disinfection efficacy in natural waters was evaluated by performing disinfection assays using four untreated surface waters of various qualities and ultra-pure buffered waters as a baseline condition for comparison. *B. subtilis*

spores were spiked in these waters and disinfection assays were conducted at 22°C using either free chlorine or chlorine dioxide. Assays using indigenous aerobic spores were also completed. The inactivation kinetics in natural and ultra-pure buffered waters were not statistically different (at $p=0.05$) while using free chlorine, as long as disinfectant decay was taken into account. Filtering natural waters through a 0.45 μm did not improve the sporicidal efficacy of chlorine. For three out of the four waters tested, the efficacy of chlorine dioxide was greater in natural waters compared to that observed in ultra-pure buffered waters. Such results are consistent with previous observations using ultra-pure waters supplemented with NOM-extract from the Suwannee River. Similarly to free chlorine results, the impact of filtration (0.45 μm) on the efficacy of chlorine dioxide was not statistically significant.

Key words: Drinking water, natural waters, disinfection, spores, chlorine, chlorine dioxide

6.1 INTRODUCTION

The impact of water quality on the efficacy of disinfection has been recognized for several decades. In accordance with the scientific methodology, scientists have avoided the potential confounding effects of water quality by using synthetic waters, typically ultra-pure buffered water with minimal disinfectant demand. This approach has been useful to study the resistance of microorganisms to various disinfectants in a reproducible manner and to describe the influence of fundamental variables that can be easily adjusted in the laboratory (such as temperature and pH).

Variables influencing the efficacy of disinfection can be classified into three groups: (i) variables influencing the **activity** of the disinfectant chemical, (ii) variables interfering with the **availability** of the disinfectant in the source water, and finally, (iii) variables interfering with the **accessibility** of the disinfectant to the target organism.

The first group of variables (activity) includes water quality parameters such as pH and temperature, which can both alter the activity of free chlorine through the modification of HOCl/OCl^- equilibrium (Morris, 1966) or the slowing down of the chemical reactions in agreement with Arrhenius Law (Wickramanayake, 1984; Clark et al., 1989; Faust and Aly, 1998; Rennecker et al., 1999). This group has been extensively investigated over the years, to the point that the influence of pH and temperature was included in the 1989 USEPA Regulation (USEPA, 1989).

The second group of variables (availability) concerns all inorganic and organic compounds able to react with the disinfectant and, therefore, reduce its availability for disinfection. Nitrogenous compounds, organic matter, iron, and manganese are some examples of such products. Traditionally, the influence of these variables has been accounted for through the use of various kinetic models. For example, disinfection efficacy can be described using the CT concept, in which C represents the residual concentration of disinfectant (USEPA, 1989) or the effective CT is described by the area under the disinfectant decay curve (McGrath and Johnson, 1979; Haas et al., 1996).

The last group of variables (accessibility) is undoubtedly the most difficult to study and describe mechanistically. Microorganism shielding or entrapment may cause interference with the disinfectant action (Ridgway and Olson, 1982). The adsorption of viruses onto particles (Stagg et al., 1977), the formation of *Vibrio cholerae* aggregates (Clark et al., 1994), and the occlusion of *Legionella pneumophila* or *Mycobacterium avium* within amoebas (Steinert et al., 1998) are examples of such phenomena. Biofilm disinfection is also a situation for which disinfectant action is hindered, in this case by exopolymeric substances (Koudjonou et al., 1998; Morin et al., 1999); the presence of such matrix can be influenced by growth conditions (Chan et al., 1984).

6.2 OBJECTIVES

Disinfection efficacy will be optimal for conditions where the activity, availability, and accessibility of the disinfectant are maximized. Yet, these factors do not necessarily bear the same weight in predicting disinfection efficacy. A bench-scale project was developed in order to assess the importance of these three variables on free chlorine and chlorine dioxide in natural waters. More specifically, the role of pH (activity), natural organic matter (availability), turbidity (accessibility), and spore clumping (accessibility) was evaluated by studying *B. subtilis* spore inactivation in five source waters: four surface waters from various locations in North America and one buffered demand-free ultra-pure water (reference condition).

6.3 MATERIAL AND METHODS

6.3.1 Source Waters under Investigation

The impact of water quality parameters on disinfection efficacy was studied using surface waters provided by four participating utilities located across the Americas. The utilities provided raw waters by overnight mail delivery. The rationale about using untreated surface waters (instead of filtered waters) was to increase the opportunity to observe impacts related to natural organic matter and turbidity.

Prior to initiating the disinfection assays, the waters were characterized for the following parameters: pH, temperature, turbidity, ammonia, alkalinity, hardness, DOC, UV absorbance and background indigenous aerobic spores. These parameters are provided in Table 6-1.

The surface waters used for this study had relatively low turbidities (1.0 – 2.7 NTU). However, DOC concentrations varied from 1.96 mg C/L (Michigan) to 4.54 mg C/L (Clayton County). The latter also offered a significantly higher SUVA (5.9), a higher

color (41), and lower mineral content (alkalinity and hardness) than the other three waters. Montreal, Puerto-Rico, and Michigan waters had similar levels of alkalinity and calcium hardness.

Tableau 6-1: Participating Utilities and Water Qualities for Disinfection Assays with Natural Waters*

Parameters	SOURCE WATERS			
	MICHIGAN Grand Rapids, MI	MONTREAL Montreal, QC	PUERTO-RICO San Juan, PR	CLAYTON Clayton, GA
Alkalinity (± 2 mg/L CaCO_3)	116	85	112	36
Calcium Hardness (± 2 mg/L CaCO_3)	86	82	84	24
True Color (± 1)	< 1	2	4	41
Turbidity (± 0.1 NTU)	1.0	2.7	2.7	1.6
DOC (± 0.1 mg C/L)	1.96	2.66	4.02	4.54
Ammonia ($\pm 5\%$)	< 3	N.A.	88	32
SUVA ($\text{m}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{L}$)	1.6	2.1	3.0	5.9
UV Absorbance (cm^{-1})	0.031	0.057	0.121	0.270
pH (± 0.1)	7.6 – 7.9	7.8 – 8.0	7.5 – 7.6	7.1 – 7.3

*: Water quality as measured prior to the initiation of the disinfection assays

N.A.: Not available, 10 – 30 $\mu\text{g/L}$ historically

6.3.2 Microorganisms

Bacillus subtilis spores (ATCC6633) and indigenous aerobic spore-formers were used to investigate the impacts of water quality on disinfection. They were chosen for the following reasons: (i) they were easy and inexpensive to assay and hence allowed to perform numerous experiments, (ii) their inactivation was highly reproducible,

which permitted detecting subtle effects, (iii) their resistance is in the same order of magnitude as parasites (Barbeau et al., 1999; Facile et al., 2000).

6.3.3 Experimental Design

Table 6-2 presents the experimental matrix that was used for this project. This matrix was replicated for each of the four natural waters shown in Table 6-1 and for two disinfectants: free chlorine and chlorine dioxide. All assays were performed at room temperature (21-22°C).

Tableau 6-2: Experimental Matrix for the Study of Water Quality Impacts

No.	Objective	Water Type	Bacterial Strain	pH
#1	Reference condition	Buffered-demand free (Synthetic Water)	Spiked <i>B. subtilis</i> spores	Buffered at 6.5
#2	Evaluate water matrix effect	Raw water	Spiked <i>B. subtilis</i> spores	Buffered at 6.5
#3	Assess the buffering & pH effect	Raw water	Spiked <i>B. subtilis</i> spores	Ambient
#4	Impact of Turbidity	Raw water after 0.45 µm filtration	Spiked <i>B. subtilis</i> spores	Buffered at 6.5
#5	Impact of the target surrogate	Raw water	Indigenous aerobic spores	Buffered at 6.5

Note: All experiments were conducted at a temperature of 21.5±0.5°C

Condition #1 is the baseline condition. For this condition, *B. subtilis* spore inactivation data were obtained in buffered ultra-pure demand-free (BDF) water in the absence of turbidity (< 0.05 NTU) or DOC (< 0.2 mg C/L). For condition #2, raw waters were spiked with *Bacillus subtilis* spores and buffered at pH 6.5. As temperature and pH are dominant factors affecting disinfection, keeping them at a constant value by buffering at pH 6.5 (by comparing condition #1 and #2) allowed the study of the more subtle effects of turbidity and DOC (water matrix effects). Condition

3 is identical to condition 2, except for the absence of buffering. Disinfection assays were therefore conducted at ambient pH in order to evaluate the impact of buffering and pH. Similar to condition 2, condition 4 used natural waters buffered at pH 6.5. However, natural waters were filtered through a 0.45 μm filter (Millipore, Billerica, USA - HAWG047S3) prior to the assay. Suspended solids were removed, therefore their impact on disinfection efficacy could be evaluated by comparing these assays with results from condition 2. Finally, all four previous conditions used *Bacillus subtilis* spores as the target microorganisms, which were spiked in natural waters. The objective of the last condition (#5) was to (i) evaluate the differences in sensitivity of various indigenous aerobic spores to chlorine and chlorine dioxide with various source waters and (ii) to compare their sensitivity with *Bacillus subtilis* spores. Comparing condition #5 and #2 will illustrate the difference in resistance between *Bacillus subtilis* and indigenous aerobic spores.

6.3.4 Description of the Experimental Disinfection Procedure

Bacillus subtilis spores were spiked at least 3 Log above the natural indigenous spore concentration. Typically, this meant an initial spore concentration of at least 10^3 CFU/mL. After seeding, *B. subtilis* spores were agitated at 60 rpm for 24 hours at room temperature in order to promote interactions with suspended solids. Each condition was replicated for a low and a high disinfectant dose. A description of the general disinfection procedure can be found in Haas et al. (1993).

6.3.5 Microorganism Culture and Enumeration

A *Bacillus subtilis* culture was purchased from the American Type Culture Collection, (#6633), and a single stock culture was prepared to use in all bench scale inactivation experiments. A late Log phase suspension of *Bacillus subtilis* vegetative cells was prepared by inoculating Tryptic Soy Broth and incubating it at 35°C for 24h. R2A Agar (Becton Dickinson, Sparks, MD) was prepared according to manufacturer instructions. A 10^{-2} dilution of *Bacillus subtilis* vegetative cells was made in a

standard phosphate buffer (Standard Methods 9050A) including 20 mg/L of MnCl_2 . A small aliquot of the dilution (3 mL) was poured on top of the R2A media to form a thin layer. The vegetative bacteria were allowed to incubate at 35°C until 95% of the microorganisms had sporulated (7 days), as confirmed by phase contrast microscopy. To harvest the spores, the R2A agar was flooded with phosphate buffer (pH 7.2) and sterile glass beads were used to scrape off the spore layer. The liquid was poured into centrifuge tubes and centrifuged at 3000g for 5 min. The spores were washed four times with phosphate buffer and 0.1% Tween-80. The final suspension was filtered using a 10- μm glass fiber filter in order to remove spore clumps. The spore stock was stored at 4°C until used. For spore enumeration (indigenous and *B. subtilis*), biological samples were quenched in 1% (w/w) sodium thiosulfate and enumerated using a modified vacuum plate filtration method (Barbeau et al., 1997).

6.3.6 Oxidant Analysis

Free chlorine was measured using the DPD colorimetric method (APHA et al., 1999). Chlorine dioxide was measured using the ACVK method, which is based on the oxidation and resulting decoloration of Acid Chrome Violet K (Alizarin violet 3R, color index 6170) (Masschelein, 1989). Decoloration of ACVK was measured using a Spectronic 1001 plus (Milton Roy) spectrophotometer set at 548 nm and 5.0 cm borosilicated glass cells. The blank was prepared by adding 0.250 mL of the reducer sodium sulfite to the sample whereas 0.250 mL of Milli-Q water was added to other cells to afford the same dilution of the sample. A ratio of 0.10 mL ACVK/mL sample was experimentally determined to be best suited for the project by comparing linear regressions ($R^2 = 0.97$ for 0.1 mL ACVK/mL sample versus $R^2 = 0.83$ for 0.05 mL ACVK/mL sample).

6.3.7 Inactivation Kinetic Modeling and Statistical Analysis

Inactivation data were analyzed using the effective CT concept, for which the effective microbiological dose delivered at time t is equal to the area under the decay

curve at that specific time. Spore inactivation with chlorine dioxide was describe by a simple Chick-Watson kinetic ($\text{Log}[I] = -k \times \text{CT}_{\text{effective}}$). The inactivation kinetic with free chlorine exhibited a shoulder, which was accounted for by using a delayed Chick-Watson model (Rennecker et al. 1999), ($\text{Log}[I] = -k \times (\text{CT}_{\text{effective}} - \text{CT}_{\text{lag}})$, for $\text{CT}_{\text{effective}} \geq \text{CT}_{\text{lag}}$ and $\text{Log}[I] = 0$ for $\text{CT}_{\text{effective}} < \text{CT}_{\text{lag}}$). Statistical analyses were completed using Statistica 6.0 (Statsoft, OK, USA).

6.4 RESULTS

6.4.1 Water Matrix Effects (CND #1 vs CND #2)

Fig. 6-1 presents the inactivation of *Bacillus subtilis* spores with various untreated surface waters using either free chlorine (Fig. 6-1a) or chlorine dioxide (Fig. 6-1b). As a mean of comparison, inactivation kinetics observed in ultra-pure buffered water are also included in the figures.

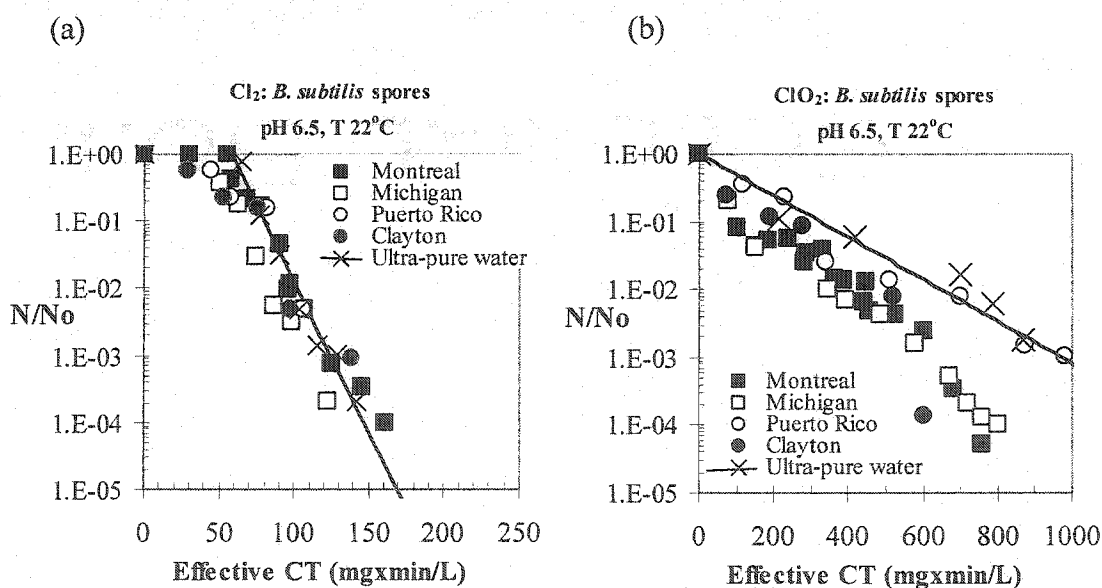


Figure 6-1: Free Chlorine (a) and Chlorine Dioxide (b) Inactivation of *B. subtilis* Spores Spiked in Various Buffered (pH 6.5) Surface Waters. Confidence bands are the 95th centile confidence intervals.

With respect to free chlorine, Fig. 6-1a indicates no statistically significant (at $p=0.05$) favorable or unfavorable impacts of performing disinfection in natural waters on chlorine disinfection, as compared to the ultra-pure water (synthetic) condition. The observed variability on the CT-2 log values (2 –16 %) is within experimental error for this type of assay and, as can be observed on Fig. 1a, the 95th centile confidence intervals for natural and ultra-pure waters kinetic overlap. Therefore, the impacts of natural turbidity and NOM on chlorine sporocidal efficacy appear to be negligible (unless they have an equal and opposite effect).

In the case of chlorine dioxide (Fig. 6-1b), results were slightly different. Initially, for inactivation less than 1 Log, the inactivation rate is independent of water quality. As the inactivation (and the contact time) increases, a divergence is observed where disinfection is more efficient for 3 out of the 4 natural waters (Ct-2 log of 649 mg.min/L for BDF water vs 391 mg.min/L in natural waters). Only the disinfection kinetic in waters from Puerto-Rico was virtually identical to the one obtained with synthetic water and it was therefore included in the same regression line on Fig. 6-1b. An explanation for the improved efficiency in natural waters concerns the role of NOM. In a previous study (Barbeau et al., 2003), we have observed that supplementing ultra-pure buffered waters with Suwannee river NOM-extract (5 mg C/L) enhanced ClO_2 disinfection efficiency by a two-fold factor, approximately. The exact difference in behaviour between Puerto-Rico waters and other waters remains to be explained, however.

6.4.2 Impact of pH/buffering (CND #2 vs CND #3)

Due to the dominant effect of pH on chlorination efficiency, it was necessary to use a phosphate buffer to maintain a stable pH. The impact of buffering natural waters to a pH of 6.5 was explored by performing disinfection assays under ambient pH conditions. Fig. 6-2 presents the observed inactivation kinetics using free chlorine.

As expected, it was observed that inactivation was more efficient under low pH conditions (data not shown). Instead, Fig. 6-2 describes inactivation according to Ct values, solely based on the theoretical concentration of hypochlorous acid ($C_{\text{HOCl}} \times t$). For each individual water, the hypochlorous acid concentrations were calculated based on the work of Morris (1966) describing the HOCl/OCl^- equilibrium as a function of water temperature. By doing so, it was confirmed that the inactivation of *Bacillus subtilis* spores is essentially dependent on the hypochlorous acid concentration (and not hypochlorites). Once CT values were expressed in terms of $C_{\text{HOCl}} \times t$, a reasonable agreement in inactivation kinetics was noticed from one natural water to another (ambient pH range: 7.1 – 7.8). The inactivation in buffered ultra-pure water appeared slightly faster, although results are quite comparable considering the uncertainty regarding the transformation of free chlorine concentration into hypochlorous acid concentrations using Morris (1966) relationships.

Results using chlorine dioxide in unbuffered natural waters are presented in Fig. 6-3. As a baseline for comparison, the average inactivation kinetics in buffered natural waters (excluding data from Puerto-Rico waters) is plotted on this graph. Puerto-Rico waters were not included in the regression, as they exhibited a different inactivation kinetic than the other three surface waters (*cf.* Fig. 6-1b).

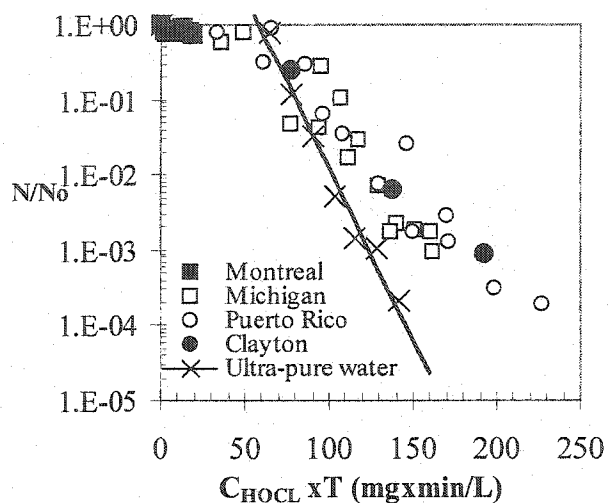


Figure 6-2: Free Chlorine Inactivation of *B. subtilis* Spores Spiked in Unbuffered (ambient pH) Surface Waters or Buffered (pH 6.5) Ultra-pure Water. Bold line represents the inactivation kinetic calculated in ultra-pure buffered water.

It was expected *a priori* that buffering at pH 6.5 would not impact chlorine dioxide efficacy since pH does not improve or impair its efficacy in this pH range (6.5-7.8) (Aieta and Berg, 1986). However, inactivation data (Fig. 6-3) were more variable than those in buffered (Fig 6-1a)/unbuffered (Fig. 6-2) waters with free chlorine or buffered waters with ClO_2 (Fig 6-1b). This phenomenon is somewhat related to the absence of buffer in the system and may suggest that ionic strength plays a role on ClO_2 efficacy.

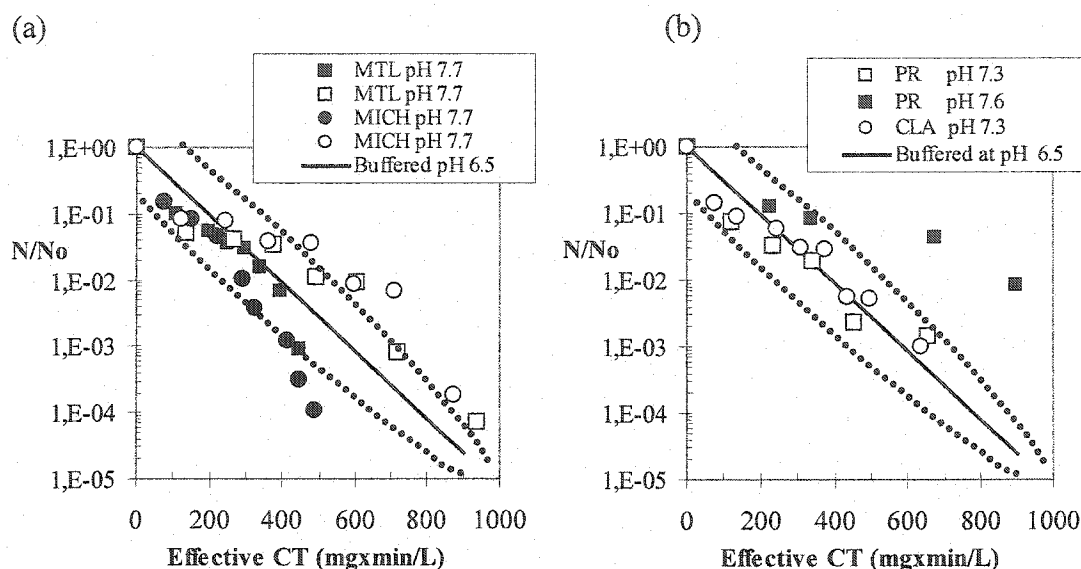


Figure 6-3: Chlorine Dioxide Inactivation of *B. subtilis* Spores Spiked in Unbuffered Surface Waters. (a) Montreal and Michigan waters, (b) Puerto-Rico and Clayton County waters. Bold and dashed lines represent the average inactivation kinetic and 95% prediction intervals respectively, calculated in buffered waters at pH=6.5 (N=5). Bold and clear symbols represent replicate reactors.

6.4.3 Impact of Turbidity (CND #2 vs CND #4)

The effect of turbidity was evaluated by comparing several disinfection assays performed in unfiltered and 0.45 μm filtered waters. Fig. 6-4a presents the results observed while using free chlorine. *Bacillus subtilis* spore inactivation spiked in buffered surface waters or buffered ultra-pure water (synthetic water) was almost identical (see Fig. 6-1). Therefore, the inactivation kinetics of *Bacillus subtilis* spores in ultra-pure water is used in Fig. 4a as a baseline for evaluating the impact of turbidity on the efficiency of free chlorine.

It was observed that filtering surface waters through a 0.45 μm filter did not improve free chlorine efficiency. Out of the six reactors assayed, all of them were equally well disinfected before or after filtration.

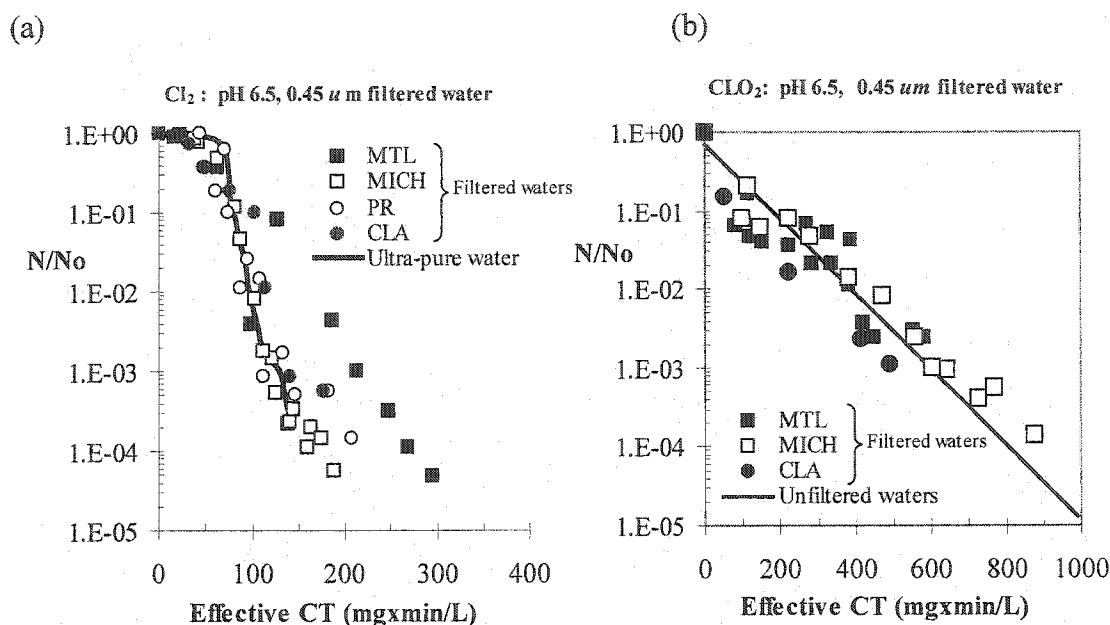


Figure 6-4: Free Chlorine (a) and Chlorine Dioxide (b) Inactivation of *B. subtilis* Spores Spiked in Filtered Surface Waters. Bold line represents (a) the inactivation kinetic in ultra-pure waters or (b) the calculated (N=5) inactivation kinetic in unfiltered waters buffered at pH=6.5.

Similarly to the evaluation of buffering, the impact of filtration on chlorine dioxide efficacy was studied by comparing filtered disinfection reactors from Montreal, Clayton, and Michigan with the average inactivation kinetic (excluding Puerto-Rico) in buffered unfiltered waters. As with free chlorine, disinfection efficiency was not significantly (at $p = 0.05$) impacted by filtration. The only significant observed impact was for Clayton waters (Fig. 6-4b), for which disinfection improved by 30% due to filtration.

6.4.4 Comparison of Indigenous and *B. subtilis* Spore Inactivation

Inactivation assays were conducted using the spore population naturally occurring in surface waters. The main challenge in this type of assay arises from the low spore concentrations observed in surface waters (typically 1 to 100 CFU/mL), which limits the maximum measurable Log inactivation. Not enough log inactivation was obtained in Montreal waters and, therefore, data were not included in the analysis.

Fig. 6-5 presents the inactivation observed using free chlorine (Fig. 6-5a) and chlorine dioxide (Fig. 6-5b) for the three remaining surface waters under investigation. The maximum inactivation quantified was less than 3 Log. Data from the inactivation of *Bacillus subtilis* spores in ultra-pure buffered water was also included for comparison purposes.

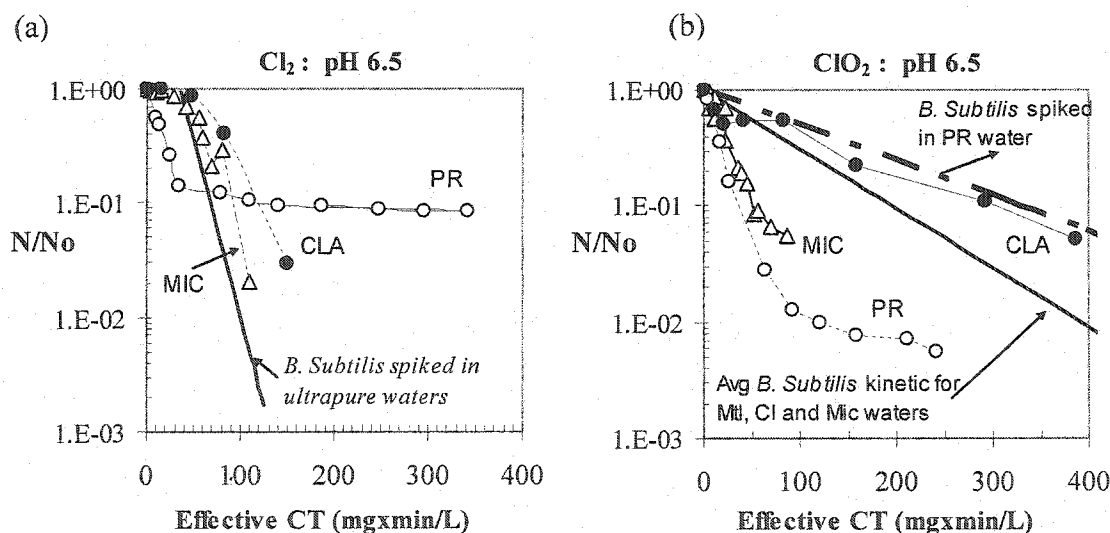


Figure 6-5: Free Chlorine (a) and Chlorine Dioxide (b) Inactivation of Indigenous Spores in Surface Waters. Bold lines w/o symbols indicate *B. subtilis* inactivation kinetic in natural water as a means of comparison.

Results using free chlorine (Fig. 6-5a) indicated a similar inactivation kinetic between indigenous spores from Michigan waters and *B. subtilis* spores. The inactivation kinetic in Clayton waters was also similar in terms of lag phase, but indigenous spores were inactivated more slowly beyond this phase. Most interestingly,

inactivation data in waters from Puerto Rico produced a significant tailing. These spores were initially inactivated quite rapidly compared to those of other surface waters, but was followed by a high resistance to chlorination. This observation suggested that these naturally occurring spores are either composed of various species having significant differences in sensitivity toward free chlorine or that a portion of the indigenous spore population (around 10%) is clumped and therefore protected from chlorine.

Results with chlorine dioxide confirmed the importance of tailing for the spores and waters from Puerto Rico (Fig. 6-5b). Indigenous spores from Puerto Rico waters were less resistant than spiked *Bacillus subtilis* spores or indigenous spores from other source waters. Similar to free chlorine results, indigenous spores from Clayton exhibited a lower susceptibility to chlorine dioxide than *Bacillus subtilis* or Michigan spores. Overall, the spores' relative resistance was the same for free chlorine and chlorine dioxide; from most to least resistant, they are : Clayton, *B. subtilis*, Michigan, and Puerto Rico spores.

6.5 DISCUSSION

Temperature is the most important variable impacting the activity of oxidant-based disinfectants. The only exception to this trend comes from the role of pH on free chlorine activity, although it could also be argued that free chlorine is actually composed of two disinfectants (HOCl and OCl^-). Temperature effects are usually described by their impact on CT values following a 10°C drop in temperature. These effects are commonly within a range of 1.5 to 3.0, which means that temperature can induce roughly a 10-fold impact under typical drinking water applications (0.5°C - 25°C).

By comparison, it has been suggested by previous studies (Stagg et al., 1977; Boardman and Sproul, 1977; Hoff, 1978; Boyce et al., 1981; Springthorpe et al., 2001;

Barbeau et al., 2003) that minimal protection is provided to microorganisms through their attachment to clays (bentonite or kaolinite). The highest protection was measured by Stagg et al. (1977) : a 2-fold unfavorable effect for chlorine disinfection of MS2 viruses. Although the natural water turbidities of the investigated waters are not composed of bentonite or kaolinite (i.e. 100% inorganic), it was observed during this study that reducing turbidity with a 0.45 μm filter had a limited impact on disinfection efficacy of both chlorine and chlorine dioxide. For chlorine, no significant impact on turbidity was noted out of six valid reactors assayed. For chlorine dioxide, only one out of the six reactors assayed showed an improvement in disinfection efficiency following filtration: disinfection in Clayton surface water was improved approximately 30% by a 0.45 μm filtration.

Apart from the obvious case where an organism is entirely occluded inside a particle or within another organism, the clumping of microorganisms is probably the most difficult challenge for water disinfection. As early as 1967, Berg et al. attributed aberration in survival curves with respect to the Chick-Watson kinetic to the effect of aggregation or clumping. For example, bacterial aggregates of a mucous strain of *V. cholerae* have been shown to be over tenfold more resistant (based on Ct-4 log values) than the non-mucous counterpart (Clark et al., 1994). Similarly, Sharp et al. (1976) observed an approximate 3-fold increase in resistance of small (2-10 μm) reovirus aggregates to bromine.

In the current project, tailing was observed especially while disinfecting indigenous spores. However, *B. subtilis* spores may also clump depending on water quality/disinfectant interaction. *B. subtilis* spore aggregates are also extremely difficult to inactivate; CT values as high as 10 000 mg.min/L (i.e. 11 mg/L after 15 hours) using chlorine dioxide did not overcome such a phenomenon and hardly 1 log inactivation was achieved (Barbeau et al., 2002). Such an example is similar to the

disinfection of resuspended biofilms or wastewaters, two examples for which the presence of aggregates is a dominant variable to explain the process performance.

Aggregation may also be promoted by the disinfectant itself, as disinfectants, especially ozone (Edwards et al., 1991; Chandrakanth and Amy, 1998), have the ability to induce particle destabilization up to various degrees depending on water characteristics. In the previous example (Barbeau et al., 2002), the area of aggregates – defined for this specific assay as 2 spores or more clumped together observed under DIC microscopy – increased from $14 \mu\text{m}^2/\text{mL}$ prior to disinfection to $118 \mu\text{m}^2/\text{mL}$ after 15 hours of contact with an average of $11.1 \text{ mg ClO}_2/\text{L}$. It could be argued that bacterial aggregates in surface waters are of little relevance, as this form will increase their likelihood of being retained through settling and filtration. However, the formation of microbial aggregates during treatment is of concern if it happens during the post-filtration disinfection (usually chlorine, chloramines, or chlorine dioxide).

Disinfectant activity can be reduced tenfold by temperature alone; the efficacy of a disinfectant may also be reduced by more a greater magnitude due to reduced microorganism accessibility. In comparison, disinfectant availability (*i.e.* disinfectant persistence in treated waters) is typically a variable of less importance to water treatment specialists. Although the presence of reducing agents (ammonia, sulfides, etc.) may compromise disinfection by reducing the effective disinfectant concentration, it has become standard practice, through the use of the CT concept, to maintain a residual disinfectant concentration after a given period of time. Incorporating disinfectant demand into CT calculations enables comparison of different surface waters having variable disinfectant demands (Haas et al., 1995). During the current project, average free chlorine and chlorine dioxide concentrations in natural waters were lowered by 17% (6-25%) and 14% (5-25%) respectively, after one hour of contact time. By comparison, these concentrations were only reduced by 1 - 3% in ultra-pure waters. This information confirms that, for most surface waters, the

role of oxidant demand on drinking water disinfection efficacy is not the most important variable. Moreover, this phenomenon can be taken into account by using the traditional CT concept for which C is the residual disinfectant concentration, or the effective CT concept, as described in section 3.7.

Studies evaluating the role of natural water matrix on drinking water disinfection efficacy are limited in the literature. This situation arises from the difficulty in providing robust data sets, which can be reproduced by other scientists, the basis of the scientific methodology. Nevertheless, Owens et al. (2000) observed that ozone inactivation data obtained in a pilot-scale study using natural waters were comparable to inactivation data from bench-scale studies using demand-free buffered waters. The work of Haas et al. (1995) and Oppenheimer et al. (2000) are the most comprehensive investigations of natural water effects on disinfection efficacy to date. One of the key attributes of these two studies is how they relate the fact that inactivation data were analyzed using models accounting for disinfectant demand, which therefore allows the natural water effect to be isolated.

Haas et al. (1995) examined *Giardia* inactivation in two natural waters (Willamette and Bull Run) and compared the CT values to the EPA CT tables. For free chlorine, CT values were only 4 to 28% higher than USEPA CT values (after correcting for the inherent 1.5 safety factor used by the USEPA). Such impact is coherent with the protective effect that can be provided by inorganic turbidity, as discussed earlier.

In 2001, Finch et al. (2001) reviewed available *Cryptosporidium* ozone inactivation data, which included the data set of Oppenheimer et al. (2000) for 8 unfiltered and filtered natural waters in cold water conditions (3°C). This analysis indicated that these natural waters could be classed in three general groups in terms of *Cryptosporidium* inactivation kinetics. Interestingly, it was observed that temperature effects were water-specific, which led the authors to conclude that much of the role of water quality

remains to be understood. Considering the large numbers of control variables and potential interactions, including some variables unidentified at this time or recently recognized (Haas et al., 2003), additional research is warranted in this domain.

6.6 CONCLUSIONS

The impact of disinfection efficacy in natural waters was evaluated by performing disinfection assays using four untreated surface waters and one ultra-pure buffered water. *B. subtilis* spores were spiked in these waters and disinfection assays were conducted at 21-22°C using free chlorine or chlorine dioxide. The following conclusions were drawn from this investigation:

- Inactivation kinetics in natural and ultra-pure buffered waters were not statistically different (at $p=0.05$) while using free chlorine, as long as disinfectant decay was taken into account. Filtering natural waters through a 0.45 μm did not improve chlorine sporicidal efficacy.
- For three out of the four waters tested, chlorine dioxide efficacy was improved in natural waters compared to ultra-pure buffered waters. Such a result is consistent with previous observations while using ultra-pure waters supplemented with NOM-extract from the Suwannee River.
- Similarly to free chlorine results, the impact of filtration (0.45 μm) on chlorine dioxide efficacy was not statistically significant.
- The inactivation kinetic of indigenous spores varied from one source water to another. However, the relative resistance of the spores to disinfection followed the same trend for free chlorine and chlorine dioxide, from most to least resistant, they are : Clayton, spiked *B. subtilis*, Michigan, and Puerto Rico indigenous spores.

Acknowledgements

This work was funded by the American Water Works Association Research Foundation and was also supported by the NSERC-Industrial Chair on Drinking Water at the École Polytechnique de Montréal. The authors wish to thank Mélanie Rivard and Géraldine El-Baz for their assistance in completing the laboratory experiments.

6.7 REFERENCES

- American Public Health Association, American Water Works Association, and Water Environment Federation. (1998) Standard methods for the examination of water and wastewater. 20th ed., Washington D.C., USA.
- Aieta, E.M. and Berg, J.D. (1986) A review of chlorine dioxide in drinking water treatment. *Journal of the American Water Works Association*, **78**(6), 62-72.
- Barbeau, B., Boulos, L., Desjardins, R., Coallier, J., Prevost, M., Duchesne, D. (1997) A modified method for the enumeration of aerobic spore-forming bacteria. *Canadian Journal of Microbiology*, **43**, 976-980.
- Barbeau, B., Boulos, L., Desjardins, R., Coallier, J., Prévost, M. (1999) Examining the use of aerobic spore-forming bacteria to assess the efficiency of chlorination. *Water Research*, **33**(13):2941-2948.
- Barbeau, B., Huffman, D., Rivard, M., Chandrakanth M. (2002) Impacts of water quality on the inactivation of viral and bacterial surrogates, *In: Proceedings of the WQTC, AWWA, Seattle, Washington, USA*.
- Barbeau, B., Huffman, D., Mysore, C., Desjardins, R., Prevost, M. (2003) Examination of discrete and confounding effects of water quality parameters during the inactivation of MS2 phages and *Bacillus subtilis* spores with free chlorine. *Journal of Environmental Engineering & Sciences*, In press.
- Berg, G., Clark, R.M., Berman, D., Chang, S.L. (1967) Aberration in survival curves. *In: Transmission of viruses by the water route*. Interscience Publishers, New York, NY, pp. 235-240.

- Boardman, G.D., Sproul, O.J. (1977) Protection of viruses during disinfection by adsorption to particulate matter. *Applied & Environmental Microbiology*, **49**:1857-1862.
- Boyce, D.S., Sproul, O.J., Buck, E.C. (1981) The effect of disinfection of bentonite clay on ozone disinfection of bacteria and viruses. *Water Research*, **15**:759-767.
- Brazos, B.J., O'Connor, J.T. (1996) Seasonal effects on generation of particle-associated bacteria during distribution. *Journal of Environmental Engineering*, **122**(12):1050-1057.
- Camper, A.K., LeChevallier, M.W., Broadway, S.C., McFeters, G.A. (1986) Bacteria associated with granular activated carbon particles in drinking water. *Applied & Environmental Microbiology*, **52**(3):434-438.
- Chan, R., Lam, J.S., Lam, K., Costerton, J.W. (1984) Influence of growth conditions on expression of the mucoid mode of growth of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of clinical microbiology*, **19**(1):8-16.
- Chandrakanth, M.S., Amy, G.L. (1998) Effects of NOM source variations and calcium complexation capacity on ozone-induced particle destabilization. *Water Research*, **32**(1), 115-124.
- Clark, R.M., Read, E.J., Hoff, J.C. (1989) Analysis of inactivation of *Giardia lamblia* by chlorine. *Journal of Environmental Engineering*, **115**(1): 80-90.
- Clark, R.M., Rice E.W., Pierce, B.K., Johnson, C.H., Fox, K.R. (1994) Effect of aggregation on *Vibrio cholerae* inactivation. *Journal of Environmental Engineering*, **120**(4), 875-887.
- Edwards, M., Benjamin, M.M. (1991) Mechanistic study of ozone-induced particle destabilization. *Journal of the American Water Works Association*, **83**(6), 96-105.
- Facile, N., Barbeau, B., Prévost, M., Koudjonou, B. (2000) Evaluating bacterial aerobic spores as a surrogate for *Giardia* and *Cryptosporidium* inactivation by ozone. *Water Research*, **34**(12):3238-3247.
- Faust, S.D., Aly, O.M. (1998) Chemistry of Water Treatment. Ann Arbor Press, 2nd ed.

- Finch, G.R., Haas, C.N., Oppenheimer, J.A., Gordon, G., Trussell, R.R. (2001). Design criteria for ozone inactivation of *Cryptosporidium* in drinking water. *Ozone Science and Engineering*, **23**(4), 259-284.
- Haas, C.N., Hornberger, J.C., Anmangandla, U., Heath, M., Jacangelo, J. (1993) Experimental Methodologies for the Determination of Disinfection Effectiveness. AWWA Research Foundation, Denver CO, USA.
- Haas, C.N., Joffe, J., Hornberger, J.C., Anmangandla, U., Heath, M., Jacangelo, J. (1995) Development and Validation of Rational Design Methods of Disinfection, AWWA Research Foundation, Denver, CO., USA.
- Haas, C.N., Joffe, J., Anmangandla, U., Jacangelo, J.G., Heath, M. (1996) Water quality and disinfection kinetics. *Journal of the American Water Works Association*, **88**(3):95-104.
- Haas, CN. And B. Kaymak. (2003) Effect of initial microbial density on inactivation of *Giardia muris* by ozone, *Water Research*, **37**(12), 2980-2988.
- Hoff, J.C. (1978) The relationship of turbidity to disinfection of potable water. In: Evaluation of the Microbiology Standards for Drinking Water. USEPA-570/9-78-006, Washington, D.C., 235 p.
- Koudjonou, B.K., Prévost, M., Lafrance, P. (1998) Chlorine versus chloramine: impact on the composition of a drinking water biofilm, In: Proceedings of the WQTC, AWWA, San Diego, CA.
- Masschelein, W.J. (1989) Determination of residual ozone or chlorine dioxide in water with ACVK – an Updated Version. *Ozone Science and Engineering*, 1989; **11**:209-215.
- McGrath, T.S. and Johnson, J.D. (1979) Microbiological dose as a measure of disinfection. In: Water Chlorination: Environmental Impact & Health Effects; **3**:687-695.
- Morin, P., Gauthier, V., Saby, S., Block, J.C. (1999) Bacterial resistance through attachment to particles and pipe surfaces in drinking water distribution systems. In:

- Proceedings of the international conference of the Royal Society of Chemistry, Biofilms in Aquatic Systems, **242**:171-192.
- Morris, J.C. (1966) The Mechanism of the hydrolysis of chlorine. *Journal of the American Chemical Society*, **68**:1692-1697.
- Oppenheimer, J., Najm, I., Trussell, R.R., Aieta, E.M., Jacangelo, J. (2000) Constructing a CT table for *Cryptosporidium* inactivation with ozone in low TOC and low turbidity waters, *Water Supply*, **18**(1):427-430.
- Owens, J.H., Miltner, R.J., Rice, E.W., Johnson, C.H., Dahling, D.R., Schaefer III F.W., Shukairy, H.M. (2000) Pilot-Scale Inactivation of *Cryptosporidium* and other microorganisms in natural waters. *Ozone Science and Engineering*, **22**(5):501-517.
- Rennecker, J.L., Marinas, B., Owens, J.H., Rice, E.W. (1999) Inactivation of *Cryptosporidium parvum* oocysts with ozone. *Water Research*, **33**:2481-2488.
- Ridgway, H.F., Olson, B.H. (1982) Chlorine resistance patterns of bacteria from two drinking water distribution systems. *Applied & Environmental Microbiology*, **44**(4):972-987.
- Sharp, D.G., Floyd, R., Johnson, J.D. (1976) Initial fast reaction of bromine on reovirus in turbulent flowing water. *Applied & Environmental Microbiology*, **31**(2), 173-181.
- Springthorpe, S., Sander, M., Nolan, K., Sattar, S.A. (2001) Comparison of static and dynamic disinfection models for bacteria and viruses in water of varying quality. *Water Science & Technology*, **43**(12), 147-154.
- Stagg, C.H., Wallis, C., Ward, C.H. (1977) Inactivation of clay-associated bacteriophage MS-2 by chlorine. *Applied & Environmental Microbiology*, **33**(2):385-391.
- Steinert, M., Birkness, K., White, E., Fields, B., Quinn, F. (1998) *Mycobacterium avium* bacilli grow saprozoically in coculture with *Acanthamoeba* polyphaga and survive within cyst walls. *Applied & Environmental Microbiology*, **64**(6):2256-2261.

USEPA Guidance Manual for Compliance with Filtration and Disinfection requirements for Public Water Supplies Using Surface Water Sources. (1989) National technical information services (www.ntis.gov), Springfield, Va., USA.

Wickramanayake, G.B. (1984) Inactivation of *Naegleria* and *Giardia* cysts in water by ozonation. *Journal of the Water Pollution Control Federation*, **56**(8): 983-988.

CHAPITRE 7

DISCUSSION GÉNÉRALE ET SYNTHÈSE

Cette synthèse décrit les faits marquants obtenus durant ce projet d'études doctorales. On discutera d'abord de l'originalité de l'approche expérimentale proposée en terme de modélisation cinétique et statistique. Dans un deuxième temps, on récapitulera l'ampleur des effets observés de la qualité de l'eau sur l'efficacité des désinfectants. Par la suite, on comparera l'efficacité relative des différents désinfectants étudiés pour l'inactivation des virus MS2 et des spores de *B. subtilis* et discuterons des différences probables au niveau des mécanismes d'action des hypochlorites et du bioxyde de chlore. Enfin, on terminera en considérant la représentativité de nos résultats en eaux synthétiques par rapport aux eaux naturelles et en présentant les retombées concrètes de ce projet pour les traiteurs d'eau.

7.1 ORIGINALITÉ DE L'APPROCHE EXPÉRIMENTALE RETENUE

7.1.1 *Méthodologie statistique : Utilisation des plans fractionnaires*

L'étude de l'influence de la qualité de l'eau sur l'efficacité de la désinfection des eaux potables représente un défi complexe en raison non seulement de l'abondance des variables en jeu, mais également du fait que plusieurs de ces variables sont confondues entre elles. À titre d'exemple, la température de l'eau agit sur la cinétique de réaction des hypochlorites mais également sur la spéciation du chlore libre en solution.

L'utilisation d'une approche statistique robuste et systématique a cependant permis d'éviter plusieurs écueils observés dans les études parues à ce jour dans le domaine. En effet, l'évaluation simultanée de l'impact de quatre paramètres de qualité d'eau (pH, température, matière organique et turbidité) est une première dans le domaine.

Traditionnellement, les études se limitent généralement à étudier, au mieux, trois variables en raison de la charge de travail nécessaire. De plus, ces variables sont étudiées successivement (et non simultanément). Cette situation fait en sorte que les effets d'interaction entre les variables ne sont généralement pas étudiés. Dans le cas présent, le recours aux plans statistiques fractionnaires a permis de contourner ce problème et a démontré que les effets d'interaction sont souvent significatifs et ne peuvent donc pas être négligés. À titre d'exemple, l'effet de la température sur l'efficacité de la chloration est exacerbé à pH basique.

Il est également à noter que l'utilisation de plans statistiques accroît de façon importante la robustesse des résultats obtenus en raison de la nécessité de répartir aléatoirement dans le temps les essais à réaliser. Dans le cas du présent projet, cette contrainte se traduisait par une répartition des essais d'une matrice donnée (e.g. spores-Cl₂) sur une période d'environ 3 mois. Pendant cette période, il était impossible de tirer des conclusions sur la cohérence des résultats produits au laboratoire puisque deux variables étaient modifiées simultanément pour chacun des types d'eaux étudiées. Cette façon de faire met grandement à l'épreuve la patience des expérimentateurs compte tenu des nombreuses difficultés pouvant faire échouer les essais.

Néanmoins, la répartition des essais sur une longue période a été bénéfique à l'étude puisque cette approche nous aura permis de mettre à jour un phénomène non documenté à ce jour. En effet, il a été constaté que la résistance des virus MS2 à la désinfection était influencée par leur durée de stockage à 4°C et ce, malgré le fait que la concentration de la solution-mère demeurait inchangée. Ce phénomène se développe progressivement au cours du temps jusqu'à représenter une baisse de 100% de la résistance de MS2 à la chloration après 8 semaines. L'explication proposée est à l'effet qu'un changement au niveau de la capside du virion se produit avec le temps. Or, la capside a un rôle déterminant à jouer dans le processus d'infection de *E. coli*. Récemment, Jolis (2002) a également observé un phénomène similaire chez une

souche de MS2 exposée au rayonnement UV. Compte tenu du nombre élevé d'études utilisant les bactériophages MS2, il apparaît surprenant que ce phénomène n'ait jamais été documenté par le passé. Avant de débiter ce projet, la pratique courante voulait que la souche de MS2 produite soit conservée un maximum de 6 mois à 4°C (Haas et al., 1995). Cette situation découle du fait que les chercheurs ne tentent généralement pas de reproduire leurs résultats à plusieurs mois d'intervalle. Généralement, les essais sont répétés lors d'une même journée. Les conditions d'essai sont alors changées d'une journée à l'autre. L'utilisation d'un plan expérimental fractionnaire aura donc permis d'observer ce phénomène puisque l'on devait plutôt répartir les essais sur une période de trois mois. Sans cette contrainte, ce phénomène n'aurait probablement jamais été observé.

Afin de solutionner cette problématique, il est proposé d'ajouter une contrainte supplémentaire qui devrait être intégrée à tout futur projet de désinfection. La reproductibilité temporelle devrait être évaluée pour la durée des essais. Cette contrainte peut être facilement remplie en ajoutant un réacteur additionnel durant les essais, lequel reproduirait une condition standard prédéterminée. Par ailleurs, dans le cas spécifique des essais utilisant les virus MS2, la durée de stockage maximale des virions devrait être limitée à 1 semaine selon les observations obtenus durant ce projet, ce qui devrait limiter à 20% leur accroissement de susceptibilité aux désinfectants.

7.1.2 Modélisation cinétique : Utilisation du concept de CT_{effectif}

Depuis la démonstration de la relation de Chick-Watson en 1908, la majorité des travaux dans le domaine de la désinfection ont utilisé ce modèle pour décrire la cinétique d'inactivation. Cette relation stipule que le log d'inactivation est directement proportionnel au produit de la concentration et du temps de contact. En pratique, des déviations à cette relation sont observées depuis les années 1940. La présence d'une phase de latence et d'une phase de *tailing* représentent les déviations typiquement observées. Plutôt que d'approcher ce problème d'un point de vue mécanistique, la

majorité des chercheurs ont plutôt choisi de recourir à la relation de Hom (1972), laquelle permet de modéliser ces déviations à l'aide d'un artifice mathématique.

Dans le cadre de cette étude doctorale, on a privilégié une approche qui permet d'isoler les effets de latence et de *tailing* afin de les étudier séparément de la phase de décroissance exponentielle. En effet, l'utilisation d'un modèle de Chick-Watson avec latence a permis, en plus de décrire efficacement l'inactivation des spores par la chloration, de démontrer que la dose¹ requise pour dépasser la phase de latence (CT_{lag}) est en moyenne 3 à 4 fois moins sensible aux variations de qualité d'eau comparativement au CT requis pour atteindre 2 log d'inactivation. Cette observation est cohérente avec le fait que la tunique sporale est une barrière physique limitant la diffusion du désinfectant, ce qui rend l'inactivation des spores moins sensible aux variations de qualité d'eau.

Les phénomènes de *tailing* observés lors de l'inactivation des coliphages MS2 et des spores de *B. subtilis* par le bioxyde de chlore ont été modélisés avec succès à l'aide de deux équations de Chick-Watson en parallèle, l'une décrivant l'inactivation des microorganismes libres et l'autre celle des microorganismes agrégés. Cette stratégie de modélisation est très avantageuse puisqu'elle permet (i) d'isoler l'influence de la qualité de l'eau sur la formation d'agrégats microbiens et (ii) de comparer la résistance relative des sous-populations libre et agrégée. Grâce à cette approche, on a, par exemple, pu constater que la résistance accrue des virus MS2 au bioxyde de chlore à pH 6.5 était causée par la présence d'agrégats et non par une réduction d'efficacité du bioxyde à faible pH. En résumé, la modélisation des phénomènes d'inactivation devrait viser une description mécanistique des résultats observés, plutôt que simplement empirique. Cette philosophie offre un nouveau champ d'étude dans le domaine de la désinfection et devrait permettre d'approfondir indirectement les

¹ La notion de dose est utilisée dans cette synthèse au sens de dose microbiologique (CT) et non au sens de la dose (concentration) d'un désinfectant.

connaissances sur les mécanismes de réaction en jeu durant le processus de désinfection.

7.2 EFFICACITÉ RELATIVE DES DÉSINFECTANTS

Ce projet a permis d'étudier l'efficacité du bioxyde de chlore et du chlore libre. Cependant, à titre de comparaison, on présentera également les résultats de Mysore et al. (2003), lesquels ont été obtenus à l'Université de Colorado avec la même procédure expérimentale (qualité d'eau et organismes cibles) mais en utilisant l'ozone (O_3) et les monochloramines (NH_2Cl). Cette comparaison fait l'objet de la figure 7-1.

Un des premiers constats découlant de la figure 7-1 tient au fait que les différences de CT-2 log d'une combinaison organisme-désinfectant à l'autre sont énormes, plus de quatre ordres de grandeurs ($> 10\ 000$). En fait, pour une dose (CT) de désinfectant donnée, les deux variables les plus importantes pour décrire l'efficacité de la désinfection sont : (i) le type de désinfectant utilisé et (ii) le microorganisme visé par la désinfection. Par exemple, parmi les quatre désinfectants étudiés, il a été observé que la dose médiane requise pour inactiver les spores de *B. subtilis* était supérieure d'un facteur 950 (600 - 1480) entre le pire désinfectant (NH_2Cl) et le meilleur (O_3). Similairement, l'ozone était 110 et 400 fois plus efficace que le chlore et le bioxyde de chlore, respectivement.

Vu sous cet angle, la performance relative du chlore et du bioxyde de chlore était similaire, bien que le chlore eût tout de même été 3.5 (2.3 – 21) fois plus efficace que le ClO_2 pour l'inactivation des spores. Ce dernier résultat est surprenant à deux égards. D'une part, le bioxyde est réputé être un meilleur désinfectant, en particulier en ce qui a trait à l'inactivation des organismes résistants à la désinfection tels que les parasites. D'autre part, on a vu au chapitre 6 que l'inactivation des spores était immédiate (aucune phase de latence). Cependant, le bioxyde de chlore favorisait la formation d'agrégats et cette situation explique en partie la moins bonne performance du bioxyde

de chlore par rapport au chlore. Comme le chlore libre est composé d'hypochlorites et d'acide hypochloreux selon le pH de chloration, une comparaison plus pointue des résultats indique que l'acide hypochloreux est en moyenne 2.3 fois plus efficace que le bioxyde de chlore, lequel est lui-même en moyenne 4.3 fois plus efficace que les ions hypochlorites pour l'inactivation des spores.

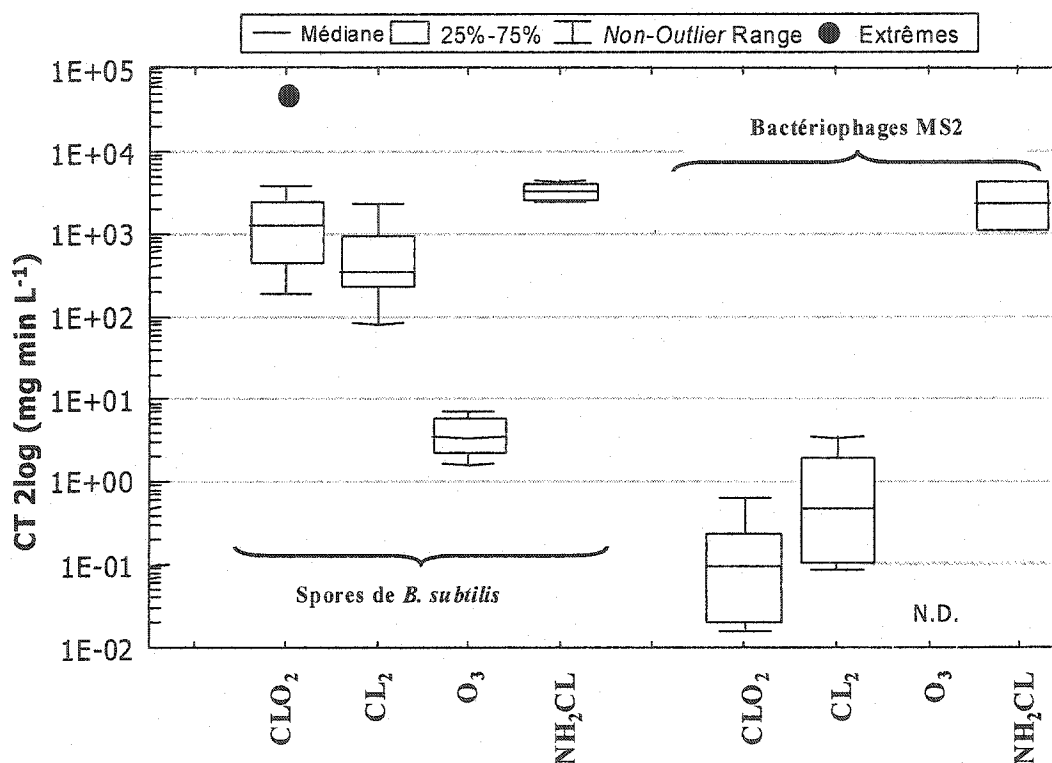


Figure 7-1: Comparaison des doses requises pour inactiver 99% (CT – 2log) de divers organismes à l'aide du chlore et du bioxyde de chlore. Les variations de doses observées correspondent aux variations causées par la qualité de l'eau (pH, turbidité, température, COD). Source des données O_3 et NH_2Cl : Mysore et al., 2003.

Le bioxyde de chlore était en moyenne cinq fois plus efficaces que le chlore pour l'inactivation des virus MS2. Cependant, tout comme pour les spores, une analyse plus fine révèle que l'acide hypochloreux est en moyenne 1.3 fois plus efficace que le bioxyde de chlore, lequel est lui-même en moyenne 11 fois plus efficace que les ions

hypochlorites pour l'inactivation de MS2. La faible performance des ions hypochlorites explique donc pourquoi le bioxyde de chlore est globalement supérieur au chlore pour l'inactivation de MS2.

Bien qu'importantes, les variations d'efficacités relatives des différents désinfectants sont surpassées par la variation de résistance observée d'un microorganisme à l'autre. Par exemple, les résultats dont on dispose indiquent que les virus MS2 sont 13 000 (12 000 – 77 000) fois plus sensibles et 730 (670 – 960) fois plus sensibles que les spores de *B. subtilis* au bioxyde chlore et au chlore, respectivement. Par conséquent, on peut conclure que le choix de la cible visée par la désinfection est une variable plus importante que le choix de l'arme retenue pour y arriver.

7.3 INFLUENCE DE LA QUALITÉ DE L'EAU

À la figure 7-1, l'influence de la qualité de l'eau peut être appréciée par l'étendue des CT-2 log mesurés pour une combinaison microorganisme-désinfectant donnée. La monochloramine a été le désinfectant le moins influencé par la qualité de l'eau. Les variations observées du CT-2 log en fonction de la qualité de l'eau étaient de l'ordre de 1.8 (spores) ou 3.6 (MS2). L'efficacité de l'ozone était également peu influencée par la qualité de l'eau, les CT-2 log ayant varié au plus d'un facteur 4.4 en fonction de la qualité de l'eau. L'efficacité du bioxyde de chlore et du chlore est cependant beaucoup plus sensibles à la qualité de l'eau. Dans le cas de l'inactivation des spores par le bioxyde de chlore, une des neuf conditions d'eau à l'étude a favorisé l'apparition de larges agrégats microbiens qui furent très difficiles à inactiver. Cette condition est représentée comme une valeur extrême sur la figure 7-1. En excluant cette condition de notre analyse, il est possible de conclure que la qualité de l'eau est aussi importante pour prédire l'efficacité du bioxyde de chlore que pour prédire celle de la chloration. En effet, la qualité de l'eau a fait varier les CT-2 log de *B. subtilis* d'un facteur 20 et 28 pour le ClO_2 et le Cl_2 , respectivement. De plus, la qualité de

l'eau a fait varier les CT-2 log de MS2 d'un facteur 40 et 41 pour le ClO_2 et le Cl_2 , respectivement.

L'analyse précédente peut être raffinée en identifiant précisément le rôle de chacune des quatre caractéristiques de l'eau (pH, température, turbidité et matière organique) sur l'efficacité de la désinfection (CT-2 Log). Ce travail est résumé à la figure 7-2 à l'aide des effets standardisés. Rappelons que la standardisation d'un effet est l'opération mathématique consistant à diviser un effet par son écart-type, ce qui permet de distinguer l'influence d'une variable par rapport à l'erreur expérimentale ainsi que d'éliminer les unités (*e.g.* mg C/L). Dans le cas de la figure 7-2, les effets standardisés présentés sont les variations de CT 2 Log produites par une hausse de pH de 6.5 à 8.5, de température de 7 à 22°C, de turbidité de 0 à 5 UTN, de matière organique de 0 à 5 mg C/L (ou 2 mg C/L pour MS2). Pour le design expérimental choisi, les effets standardisés étaient jugés significatifs lorsqu'ils excédaient du double l'erreur expérimentale.

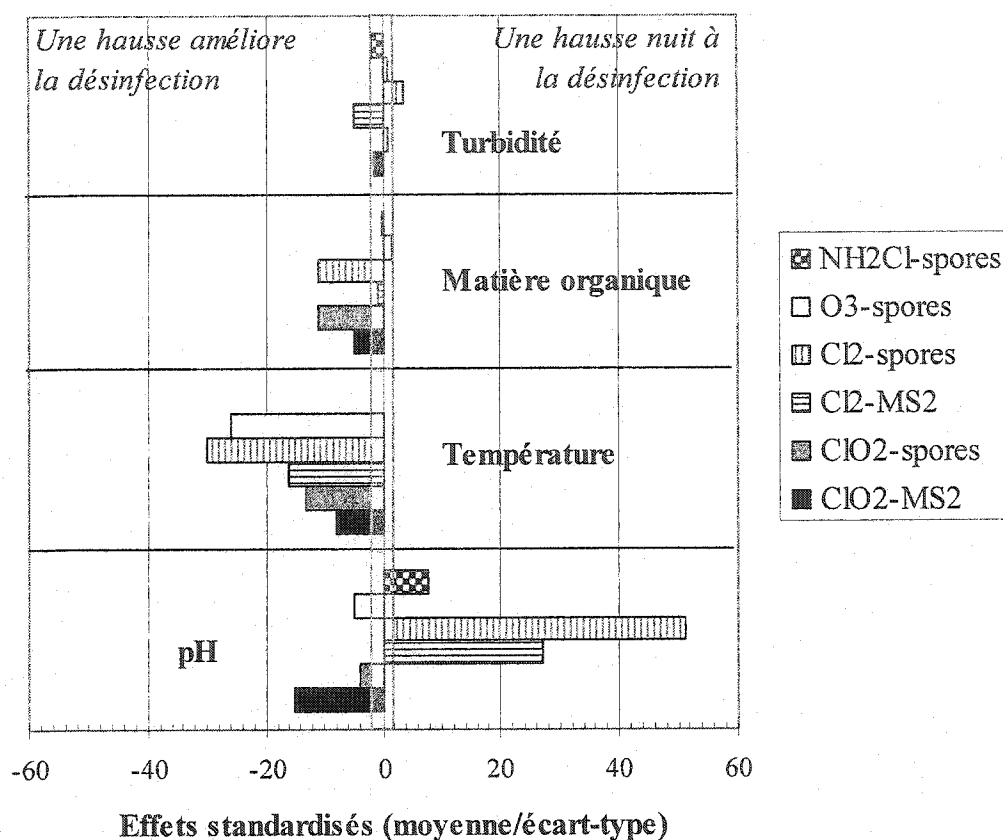


Figure 7 2: Comparaison des effets standardisés de la qualité de l'eau sur la dose requise (CT 2log) pour inactiver les spores de *Bacillus subtilis* ou les virus MS2 avec divers désinfectants. Les effets ne dépassant pas 2.1, i.e. la zone grisée, ne sont pas significatifs à $p=0.05$. Source des données O₃/NH₂Cl : Mysore et al., 2003.

Dans un premier temps, la figure 7-2 met en évidence le fait que la turbidité est la variable ayant généralement produit les plus faibles effets. Pour la majorité des essais, l'ajout de kaolin n'interférait pas significativement avec la désinfection. Les spores de *B. subtilis* ont légèrement pris avantage de la présence de kaolin lors de leur inactivation par le bioxyde de chlore ou le chlore. Les CT-2 log étaient alors augmentés d'un facteur 1.5 et 1.1, respectivement. Ce constat est cohérent avec les

travaux de Scarpino et al. (1972), Stagg et al. (1977), Boardman et Sproul (1977) et Gauthier et al. (1999) qui ont observé un effet maximal de protection de 2.0.

La turbidité est pourtant reconnue par les autorités réglementaires comme un paramètre indicateur important qui doit être limité à 5 UTN (USEPA, 1989) ou 1 UTN (MENV, 2001) afin d'éviter les interférences avec la désinfection. Il est toujours pertinent de limiter au maximum la turbidité de l'eau filtrée. En effet, l'interférence causée par la turbidité dépendra plutôt du degré d'association des microorganismes avec les particules. Dans le cas du kaolin, les virus MS2 autant que les spores de *B. subtilis* ont peu interagi avec les particules de kaolin. L'élimination du kaolin par centrifugation (1500g) n'a pas permis d'observer de baisse importante de la concentration de microorganismes dans la suspension, ce qui permet de conclure que peu d'organismes étaient attachés aux particules de kaolin.

Dans un deuxième temps, il a été observé que la présence de matière organique avait parfois (3 fois sur 6) une influence favorable au niveau de la désinfection. L'effet standardisé le plus marqué (-9.0) a été observé durant l'inactivation des spores de *B. subtilis* avec le bioxyde de chlore. L'ajout de 5 mg C/L de matière organique naturelle (Suwannee River) entraînait alors une baisse spectaculaire du CT-2 log de 2700 à 870 mg•min/L. Similairement, l'ajout de 2 mg C/L de matière organique a abaissé le CT-2 log requis pour l'inactivation de MS2 par le bioxyde de chlore de 0.34 à 0.23 mg•min/L.

Cette étude doctorale n'a pas permis de résoudre explicitement l'origine de l'effet de la matière organique sur l'efficacité de la désinfection. Il a cependant été suggéré dans le cas du bioxyde de chlore qu'un sous-produit de désinfection non-identifié avait un pouvoir désinfectant. Ce sous-produit ne serait pas les chlorites ou les chlorates, lesquelles n'ont pas de pouvoir désinfectant sur les spores selon nos essais préliminaires. Von Gunten (2003) mentionnait que le bioxyde de chlore peut probablement générer des radicaux libres lors de l'oxydation de la matière organique.

Cependant, la nature exacte de ces molécules et leurs propriétés sont inconnues. Les connaissances dans ce domaine sont essentiellement théoriques. Il est suggéré que la présence de ces radicaux accroisse le taux d'inactivation. Il a été clairement démontré par Cho et al. (2003) que les radicaux libres ($\text{OH}\bullet$) ont un pouvoir désinfectant. Il n'est donc pas impossible que certains sous-produits de désinfection inconnus puissent également avoir un effet désinfectant. Nos résultats sur l'impact favorable de la matière organique sur la désinfection ne sont d'ailleurs pas sans rappeler les effets bénéfiques de la matière organique sur l'ozonation des goûts et odeurs. Il avait été observé par Ho et al. (2000) que la performance de l'ozone était meilleure en eaux naturelles en raison de la formation de radicaux libres initiée par la présence de matière organique naturelle.

D'autre part, l'influence favorable d'une hausse de la température sur la désinfection n'était évidemment pas une surprise. Il est bien connu que les cinétiques d'inactivation obéissent à une loi d'Arrhénius. Les effets de température étaient parmi les effets les plus importants observés.

En général, les effets de température sont comparés sur la base du facteur multiplicatif du CT (*i.e.* la dose) requis pour compenser une baisse de température de 10°C . Ces facteurs, aussi appelés Q_{10} , furent, par ordre croissant d'importance, 1.3 (HOCl-MS2), 1.4 (HOCl-spores), 1.7 ($\text{ClO}_2\text{-MS2}$), 2.0 (OCI-MS2), 2.1 (OCI-spores), 2.1 ($\text{O}_3\text{-spores}$) et 2.5 (spores-ClO_2). Ces valeurs sont comprises dans la gamme usuelle (1.4 - 4.0) des valeurs publiées dans la littérature scientifique. L'acide hypochloreux se distingue nettement des autres désinfectants (ClO_2 et O_3) avec des Q_{10} toujours inférieurs à 1.5. Ce constat est très encourageant puisque les traitiers d'eau cherchent généralement à maintenir des conditions acides lors de la chloration afin de profiter de l'efficacité accrue du chlore dans cette gamme de pH. Compte tenu de l'importance de la chloration pour notre société, il est étonnant que ce phénomène soit peu documenté. En effet, il a fallu remonter aux travaux de Butterfield et al. (1943) et Fair et al. (1948) pour retracer des résultats confirmant cette observation.

Finalement, l'effet du pH sur l'efficacité de la désinfection dépend de la chimie propre à chacun des désinfectants. Ainsi, une hausse de pH de 6.5 à 8.5 favorise l'efficacité du bioxyde de chlore, alors que l'inverse est observé pour le chlore et les monochloramines. Dans le cas du chlore, cette baisse d'efficacité s'explique par la présence dominante d'hypochlorites à pH basique. Pour ce qui est de l'ozone, l'amélioration observée à pH 8.5 serait causée par la présence accrue de radicaux hydroxyles sous ces conditions. Tel que mentionné précédemment, il a été démontré par Cho et al. (2003) que les radicaux libres avaient un pouvoir désinfectant vis-à-vis les spores de *Bacillus subtilis*. L'effet défavorable d'une hausse de pH sur l'efficacité des monochloramines s'explique par le fait que la dichloramine est un désinfectant supérieur à la monochloramine. Or, les dichloramines représentent probablement entre 10 et 25% des chloramines totales à pH 6.5 alors qu'elles sont absentes à pH 8.5 (SWDC et al., 1977).

L'effet favorable de pH basique sur la désinfection au bioxyde de chlore est un constat qui s'accorde bien avec la littérature scientifique en la matière (Bernarde et al., 1965; Scarpino et al., 1979; Chen et al., 1985; Masschelein, 1992; Botzenhart, 1993; Ruffell et al., 2000; Radziminski et al., 2002). Compte tenu que cet effet est observé pour différentes classes de microorganismes (virus, bactéries, parasites), on rejette l'hypothèse voulant que cet effet soit dû à une plus grande perméabilité de la molécule de ClO_2 à travers la paroi des oocystes (Chen et al. 1985). Il est plutôt proposé que la présence accrue d'ions hydroxyles (OH^-) à pH basique catalyse la réaction d'oxydation. Cette hypothèse est supportée par le fait que la réactivité du bioxyde vis-à-vis plusieurs composés organiques s'accroît avec une hausse de pH (Hoigné et Bader, 1994).

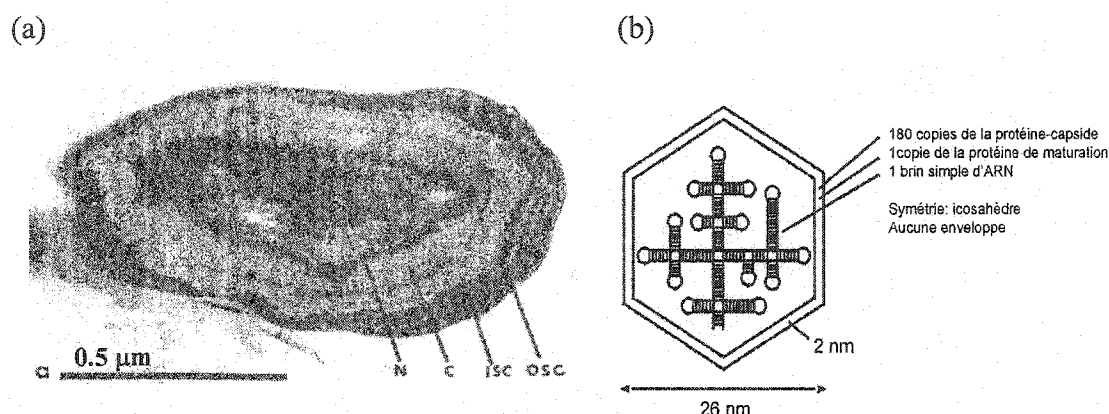
À la lumière de l'ensemble des résultats précédents, l'influence de la qualité de l'eau (variations de 1 à 2 ordres de grandeur sur les CT-2 Log) peut sembler secondaire par rapport à l'efficacité relative des désinfectants (3 ordres de grandeur de variations) ou la résistance relative des microorganismes (4 ordres de grandeur de

variations). Pourtant, ces effets ont des impacts directs sur la conception des infrastructures de traitement de l'eau potable. Ainsi, une variation d'un ordre de grandeur du CT causée par une qualité d'eau défavorable implique, à concentration équivalente, la construction de bassins de contact dix fois plus volumineux. Par ailleurs, il est vrai que les différences relatives de résistance entre les parasites et les virus sont considérables. Cependant, en pratique, le choix de l'objectif de traitement est fixé par la réglementation. Ainsi, la conception des ouvrages traitant des eaux de surface (lacs et rivières) est faite en fonction du pire cas, *i.e.* la présence de parasites enkystés.

Les grandes variations d'efficacité entre les désinfectants sont belles et bien réelles. Cependant, elles masquent une réalité qui vient limiter la portée de ce constat. En effet, bien que l'ozone fût 100 fois plus efficace que le chlore pour l'inactivation des spores, les doses d'ozone qu'il est possible d'appliquer en usine sont également environ 100 fois plus faibles que pour le chlore, en raison de la faible demi-vie de l'ozone. Par exemple, un contacteur d'ozone typique permet d'opérer à des doses de l'ordre de 1.5 à 4 mg.min/L. En comparaison, une réserve de post-chloration avec 9.25 heures de temps de contact, soit une valeur qui n'est pas inhabituelle, permet d'atteindre une performance d'inactivation des spores comparable à l'ozonation. En conclusion, les variations de performance attribuées à la qualité de l'eau ont un impact significatif sur la conception des ouvrages et constitue une des stratégies potentielles d'optimisation du procédé pour les concepteurs d'installations de traitement des eaux potables.

7.4 MÉCANISMES D'INACTIVATION

Les mécanismes d'inactivation du bioxyde de chlore et du chlore sont fonction du microorganisme visé. Dans le cadre de ce projet, les spores de *B. subtilis* sont composées de quatre éléments distincts : la tunique, le cortex, la membrane et le nucléoplaste (Figure 7-3).



**Figure 7-3: Morphologie (a) d'une spore de *B. subtilis*– adapté de Korch et Doi (1971) et (b) d'un virion de coliphage MS2. Source : wwwchem.leidenuniv.nl/genexpress/nm/
N: nucléoplaste, c: cortex, ISC et OSC: *inner and outer spore coat*.**

Le virion de coliphages MS2 est beaucoup plus simple puisqu'il est essentiellement composé d'une capside protégeant son ARN (Figure 7-3). En plus de son rôle de protection, la capside inclut certaines protéines qui participent au processus d'infection de la cellule de *E. coli*. Comme les coliphages MS2 sont des bactériophages mâles spécifiques, le processus d'infection est initié via le *pili* de certaines souches de *E. coli*. L'importance du rôle de la capside dans le processus d'infection explique probablement la faible résistance des virus MS2 au bioxyde de chlore et au chlore. Toute altération de la capside peut entraîner une perte d'infectivité. Le bioxyde de chlore réagit rapidement avec certains acides aminés vitaux, tels que l'histidine, la cystine, la cystéine, la tyrosine et le tryptophane (Masschelein, 1992), ce qui représente d'ailleurs la cause la plus probable d'inactivation des virus (Noss et al.,

1986). Le chlore libre est également très réactif vis-à-vis les protéines. Les réactions de dénaturation des protéines sont cependant plus lentes que la destruction du système enzymatique bactérien avec groupement sulfhydrile, ce qui explique la plus grande résistance des virus à la désinfection. Enfin, l'acide hypochloreux et le bioxyde de chlore ont exhibé des efficacités similaires vis-à-vis l'inactivation des coliphages MS2. Les CT-2 log moyens furent respectivement de 0.18 mg•min/L et 0.14 mg•min/L pour le bioxyde de chlore et l'acide hypochloreux, respectivement. Les ions hypochlorites (CT-2 log de 2.0 mg•min/L) étaient cependant beaucoup moins efficaces.

Les spores de *B. subtilis* sont parmi les formes de vie les plus résistantes connues. Cette résistance leur serait fournie, entre autres, par la barrière passive que constitue la tunique sporale. Celle-ci est un assemblage complexe composé d'au moins vingt-quatre polypeptides (Driks, 1999) et se subdivise en deux composantes : la section externe et interne. Le cortex constitue également un mécanisme de défense important puisque la perméabilité y est minimale et limite ainsi l'accessibilité au matériel génétique situé dans le noyau. Cependant, il ne semble pas être nécessaire d'oxyder l'ADN des spores pour parvenir à les inactiver. En effet, par analogie avec les virus MS2, le cortex a également un rôle actif à jouer, cette fois, dans le processus de germination. Conséquemment, une oxydation du cortex apparaît suffisante pour entraîner l'inactivation des spores (Young et Setlow, 2003).

Le mode d'action du bioxyde de chlore et du chlore libre sur les spores semble différer compte tenu des différences significatives observées au niveau des courbes d'inactivation. En effet, le bioxyde de chlore agit immédiatement sur la viabilité des spores alors qu'une phase de latence importante est requise dans le cas de la chloration. Compte tenu que la phase de latence est attribuée à la tunique de la spore (Bloomfield et Arthur, 1994), nous suggérons que le bioxyde de chlore possède une meilleure mobilité à travers la tunique sporale, ce qui lui permettrait alors d'endommager rapidement le cortex. Pour sa part, le chlore libre devrait débiter par

oxyder la tunique avant de pouvoir atteindre les portions vulnérables de la spore. Cette hypothèse est supportée par le fait que la température de l'eau a un faible effet sur l'efficacité du chlore, si l'on compare par rapport au bioxyde de chlore. Cette observation suggère que l'action du chlore est limitée par sa diffusion à travers la tunique sporale. La température influence en effet beaucoup moins la diffusion moléculaire que l'oxydation des molécules organiques. À cet égard, la figure 7-4 présente les énergies d'activation calculées à l'aide de la relation d'Arrhénius. Cette figure confirme que l'effet de température est important pour le bioxyde de chlore et les ions hypochlorites, ce qui suggère un mécanisme limité par des réactions enzymatiques. Dans le cas de l'acide hypochloreux (HOCl), l'énergie d'activation calculée (18-24 kJ/mole) est cohérente avec un mécanisme d'inactivation limitée par la diffusion moléculaire du désinfectant.

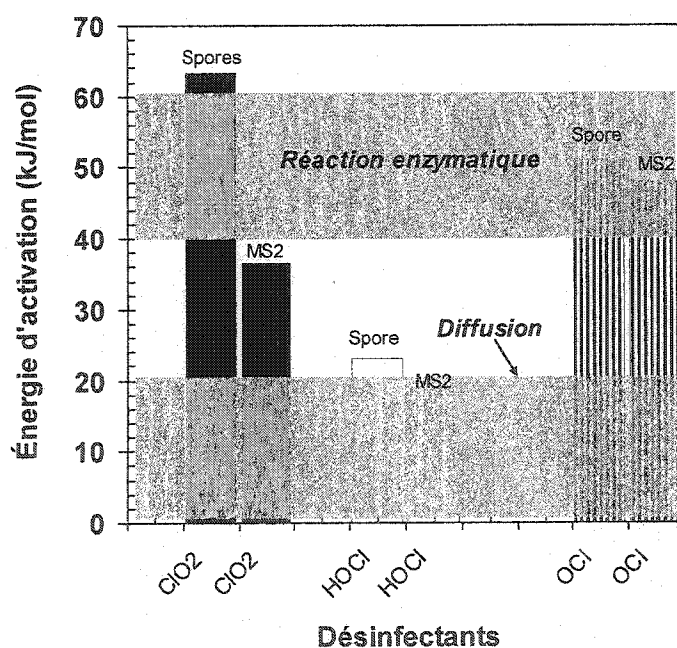


Figure 7-4: Identification à l'aide des énergies d'activation des mécanismes (diffusion vs réaction enzymatique) limitant les mécanismes d'inactivation du bioxyde de chlore et du chlore

Il est également possible que le bioxyde soit moins réactif vis-à-vis les constituants de la tunique sporale permettant ainsi d'accroître sa concentration effective sur les régions d'attaque les plus sensibles de la spore. Cette hypothèse est supportée par le fait que l'acide hypochloreux (HOCl) s'est avéré, malgré la présence d'une phase de latence initiale, un meilleur sporicide que le bioxyde de chlore. En effet, passé la phase de latence, l'inactivation des spores de *B. subtilis* était rapide de telle sorte que les CT-1 log (*i.e.* avant l'apparition du phénomène de *tailing*) étaient de 510 mg•min/L et 150 mg•min/L pour le bioxyde de chlore et l'acide hypochloreux, respectivement. Comme toujours, les ions hypochlorites étaient moins efficaces puisqu'une dose effective de 1045 mg•min/L était requise pour atteindre 1 log d'inactivation.

7.5 TRANSPOSITION DES RÉSULTATS AUX EAUX NATURELLES

La majorité des discussions de cette étude doctorale se sont appuyées sur des essais d'inactivation réalisés dans des eaux reconstituées au laboratoire. Au chapitre 6, une évaluation a été entreprise afin de confirmer les effets observés sur des eaux naturelles en provenance de trois installations en Amérique du Nord (Atlanta, GA; Grand Rapids, MI; Montréal, PQ) et une installation dans les Caraïbes (San Juan, PR). Ces essais ont été réalisés sur des eaux brutes enrichies artificiellement en spores et ayant subies divers protocoles (filtration, ajout de tampon, etc.).

Ces essais ont permis de soutenir les conclusions quant à l'impact marginal de la turbidité sur l'inactivation des spores de *B. subtilis*. Filtrer des eaux brutes dont la turbidité était de 1.0 à 2.7 UTN à l'aide d'une membrane de 0.45 µm n'a pas permis d'améliorer significativement l'efficacité du chlore ou du bioxyde de chlore (pour une dose effective équivalente de désinfectant).

L'effet favorable de la matière organique naturelle (MON) sur l'efficacité du bioxyde de chlore a également été constaté pour trois des quatre eaux étudiées. Des matières organiques naturelles différentes de celle de la rivière Suwannee (utilisée pour les eaux reconstituées) produisent donc également une amélioration de la

désinfection. L'eau de Puerto-Rico s'est cependant comportée différemment puisque aucun effet favorable de la MON n'y fut observé. Il est donc possible que cet effet soit spécifique au type de matière organique présent ou fût inhibé par certaines autres caractéristiques de l'eau. À cet égard, l'eau de Puerto-Rico se distinguait essentiellement des trois autres eaux par la présence de manganèse dissous (0.1 - 0.2 mg/L).

7.6 RETOMBÉES PRATIQUES POUR L'INDUSTRIE

L'interférence de la turbidité sur l'efficacité de la désinfection est un sujet d'une très grande importance pour le domaine du traitement de l'eau potable. En effet, la turbidité est traditionnellement utilisée comme indicateur de la qualité microbiologique des eaux et comme indicateur de l'interférence potentielle des particules sur la désinfection. Présentement, une limite maximale de 5 UTN est fixée autant aux États-Unis qu'au Québec. Exiger que la désinfection soit faite dans une eau exempte de particules équivaldrait à exiger que les eaux destinées à la consommation humaine soient toutes filtrées. Cette condition n'est présentement pas généralisée. Certaines eaux de surface de bonne qualité et la majorité des eaux souterraines sont en mesure d'éviter le recours à la filtration. La nécessité de filtrer engendre des impacts économiques importants puisque ce procédé est un des traitements les plus coûteux à mettre en place.

Il a été observé que l'impact de la turbidité inorganique non réactive sur l'efficacité de la désinfection est faible (pour une turbidité maximale de 5 UTN). Cette information est directement applicable dans le cas de certaines eaux souterraines où l'on observe beaucoup de particules d'origine inorganique (fer, silt, etc.). Dans un tel cas, une limite de 5 UTN apparaît raisonnable, d'autant plus que les microorganismes-cibles visés sont généralement des virus, lesquels sont inactivés relativement facilement. Ce résultat corrobore également les conclusions de Gauthier et al. (1999),

lesquels ont observé l'absence de protection offerte par les particules de goethite en ce qui a trait à la chloration de *Sphingomonas sp.*

Dans le cas des eaux de surface, il est nécessaire de demeurer prudent quant à l'impact des particules. Ces dernières sont en effet composées à environ 50% de particules organiques (Gauthier et al., 2001), lesquelles offrent une meilleure protection que les particules inorganiques (Hoff, 1978). Par ailleurs, il est également possible d'observer dans des eaux de surface des microorganismes entièrement occlus à l'intérieur d'organismes supérieurs. À titre d'exemple, Locas (2000) a observé une protection complète vis-à-vis de la chloration offerte aux coliformes totaux par leur inclusion dans des nématodes. Un tel constat a également été fait par rapport à la protection de *L. pneumophila* par des amibes (Kim et al. 2002).

Par ailleurs, mis à part la turbidité, les phénomènes d'agrégation sont généralement négligés. Pourtant, l'agrégation des microorganismes peut accroître leur résistance dans un ratio de 4 à 10 (Galasso et Sharp, 1965; Sharp et al., 1976; Clark et al., 1994; Grant et al., 1995). Dans le cadre de la présente étude, l'agrégation des spores et de virus MS2 augmentait leur résistance d'un facteur 18 et 21, respectivement. Cet aspect a donc un impact majeur sur l'efficacité de la désinfection. Or, cet élément n'a pas été pris en compte lors de l'établissement des tables américaines de CT qui dictent les doses de désinfectant à appliquer selon le type de microorganisme visé, le désinfectant utilisé, le pH et la température de l'eau. En effet, les données scientifiques ont été obtenues en utilisant des eaux sans particules et des microorganismes mono-dispersés. La filtration des eaux de surface permet de retenir ces agrégats et, ainsi, de se rapprocher des conditions de mono-dispersion utilisées lors de l'établissement des tables de CT. Cependant, si les agrégats se forment après la filtration, les impacts sur la désinfection pourraient alors être importants.

Dans un autre ordre d'idée, cette étude doctorale a permis de démontrer la pertinence d'évaluer la dose microbiologique selon l'aire sous la courbe de

décroissance du désinfectant. Ce constat ouvre la voie à l'implantation en usine de stratégies de contrôle des procédés de désinfection plus performantes. En effet, la dose microbiologique est actuellement calculée comme étant le produit de la concentration résiduelle mesurée à la sortie des bassins par le temps de contact (T_{10}). La concentration effective était typiquement 1.5 à 2.5 fois plus importante que la concentration résiduelle durant nos essais. Par exemple, le CT_{effectif} , calculé pour une heure de temps de chloration en présence de 5 mg C/L (Suwannee à 22°C), était de 145 mg•min/L alors que le CT basé sur la concentration résiduelle était seulement de 83 mg•min/L (*i.e.* un ratio de 1.7 en faveur du CT_{effectif}). Les installations de traitement pourraient voir leurs unités de désinfection être créditées d'une meilleure performance si elles équipaient leurs bassins de contact d'au moins deux, idéalement trois, analyseurs de désinfectant résiduel en continu. Actuellement, la majorité des installations n'utilisent qu'un seul de ces appareils localisés à la toute fin des bassins de contact.

Concernant l'effet favorable de la matière organique sur l'efficacité du bioxyde de chlore, il y a pour le moment peu d'avantages pratiques découlant de la mise à jour de ce phénomène. En effet, la présence de matière organique accroît la consommation de bioxyde de chlore, laquelle doit être compensée par une augmentation des doses appliquées. Or, la norme sur les chlorites limite l'application de bioxyde de chlore à une dose appliquée approximative de 1.4 mg/L. Par ailleurs, les résultats des essais suggèrent que le bioxyde favorise la formation d'agrégats, ce qui n'a pas été observé pour le chlore. Ce phénomène a été constaté autant pour les coliphages MS2 que pour les spores de *B. subtilis*. Or, comme on l'a vu précédemment, ce phénomène est hautement défavorable à la désinfection.

Enfin, l'idée directrice ayant menée à l'élaboration de ce projet était de confirmer l'impact des eaux naturelles sur l'efficacité de la désinfection afin d'estimer si les

facteurs de sécurité utilisés lors de la conception et de l'opération des procédés de désinfection sont appropriés. Actuellement, ces facteurs sont de trois ordres :

1. Facteurs de sécurité directement incorporés dans les tables de CT

La USEPA a publié en 1989 des tables décrivant les doses de désinfectant requises pour inactiver *Giardia* et les virus en fonction du pH et de la température. Récemment, cette même information a été publiée en ce qui concerne l'inactivation de *Cryptosporidium* par l'ozone et le bioxyde de chlore (USEPA, 2002). Les doses recommandées proviennent d'essais de désinfection en eaux ultra-pures tamponnées. En 1989, des facteurs de sécurité variant de 1.0 à 3.0 ont été ajoutés à ces valeurs. L'agrégation des microorganismes est probablement l'effet potentiel ayant les plus lourdes conséquences. En effet, ce phénomène peut réduire l'efficacité de la désinfection d'un facteur 20 selon nos observations. De plus, la résistance à la désinfection peut varier d'une souche à l'autre d'une même espèce (par exemple, *Cryptosporidium parvum*). Ces deux constats font en sorte que les facteurs de sécurité utilisés dans les tables de CT de l'EPA (1989) n'apparaissent pas très élevés. D'ailleurs, l'EPA utilise de nos jours une approche différente qui incorpore la variabilité intra-espèce dans l'établissement des doses réglementaires de désinfectant pour l'inactivation de *Cryptosporidium*.

2. Facteur de sécurité touchant le choix de la concentration pour le calcul du CT

Le calcul réglementaire du CT impose le choix de la concentration résiduelle de désinfectant pour les fins de calcul. Cette contrainte est très conservatrice compte tenu que cette valeur est la plus faible mesurée durant le processus de désinfection¹. Dans le cas de l'inactivation des spores par le bioxyde de chlore ou le chlore libre, cette exigence équivaut à un facteur de sécurité de l'ordre de 1.5 à 2.5 selon nos données. Il a été démontré dans le cadre de cette thèse que le CT_{effectif} (l'aire sous la courbe de

¹ exception faite des contacteurs d'ozone avec diffuseur poreux.

décroissance du désinfectant) était représentatif de la dose effectivement reçue par les microorganismes. Les gestionnaires d'installations de traitement des eaux ont donc tout avantage à mettre en place des mesures intermédiaires du désinfectant résiduel dans les bassins de contact afin de fractionner, autant que possible, le calcul du CT.

3. Facteur de sécurité touchant le choix du temps de contact

Le calcul réglementaire du CT impose l'utilisation du T_{10} comme mesure du temps de contact dans les bassins. Selon les cas, la valeur du T_{10} peut être de 1 à 10 fois plus élevée que le temps de contact théorique. Cependant, cette différence ne peut être considérée directement comme un facteur de sécurité, puisque la présence de court-circuit dans les bassins diminue effectivement l'inactivation. Le choix du T_{10} ne fait que décrire cette réalité, avec plus ou moins de succès selon les cas. Les gestionnaires d'installations de traitement des eaux peuvent s'assurer d'une représentation adéquate de la désinfection par l'utilisation du concept de conception intégrée de la désinfection (Bellamy et al., 1998).

CHAPITRE 8

CONCLUSIONS ET RECOMMANDATIONS

Cette étude doctorale a permis de tirer des conclusions intéressantes sur l'effet de la qualité de l'eau sur l'efficacité du chlore et du bioxyde de chlore. Ainsi,

- Il est important de considérer non seulement les effets principaux des variables de qualité d'eau (pH, turbidité, etc.) mais également les interactions entre ces mêmes variables. En particulier, l'effet de la température sur l'efficacité de la chloration varie en fonction du pH.
- L'effet défavorable d'une hausse du pH sur la chloration et l'impact de la température sur l'ensemble des désinfectants sont les effets les plus importants observés durant cette recherche.
- Une hausse du pH de 6.5 à 8.5 est favorable à l'efficacité du bioxyde de chlore vis-à-vis l'inactivation des coliphages MS2 et des spores de *B. subtilis*.
- L'effet de la turbidité d'origine minérale (kaolin) est un effet négligeable sur l'efficacité de la désinfection. La formation d'agrégats de spores ou de virions MS2 est un facteur beaucoup plus néfaste à la désinfection que la présence de particules de kaolin (5 mg/L).
- La matière organique naturelle (2-5 mg C/L) a un impact favorable et significatif sur l'efficacité du bioxyde de chlore et, dans une moindre mesure, de la chloration. Cet effet est seulement observé si l'on analyse les résultats en terme de CT_{effectif} , *i.e.* en compensant pour la demande en oxydant accrue causée par la matière organique naturelle.
- Dans l'ensemble, les conclusions dérivées des essais en eaux synthétiques sont cohérentes avec les résultats d'essais faits à partir de quatre eaux naturelles en provenance d'installations en Amérique du Nord et dans les Caraïbes.

D'autre part, en se basant sur les observations précédentes, on a émis pour les traiteurs d'eau les pratiques suivantes d'ingénierie appliquée.

- La principale opportunité pour les installations de traitement consiste à optimiser l'évaluation de la dose effective délivrée par leurs étapes de désinfection. En effet, la dose microbiologique effective est décrite par l'aire sous la courbe de décroissance (CT_{effectif}). Le calcul réglementaire sous-estime cette aire. L'ajout de points de mesures intermédiaires en continu du désinfectant résiduel est une solution simple permettant d'améliorer l'évaluation de la concentration effective. Dans le cas du temps de contact, il est nécessaire de procéder par essais de traçage, information qui peut alors être intégrée dans un modèle global d'évaluation de la désinfection de type *IDDF*.
- Les producteurs d'eau ne devraient pas utiliser la valeur limite de 5 UTN de turbidité afin d'évaluer l'interférence des particules sur la désinfection. Le degré d'interaction entre les particules et les organismes, et non la concentration de particules, définira le degré d'interférence sur la désinfection.

À la lumière des résultats obtenus durant cette thèse, il est recommandé de poursuivre les recherches en ce qui concerne l'effet favorable de la matière organique. Il serait nécessaire de confirmer ce résultat à l'aide de matières organiques de diverses origines. Il apparaît également souhaitable d'approfondir nos connaissances au sujet des phénomènes dit de *tailing*, c'est-à-dire la portion de la courbe d'inactivation pour laquelle le taux d'inactivation diminue en fonction du CT. La très vaste majorité des travaux antérieurs dans le domaine de la désinfection se sont seulement intéressés à la phase linéaire d'inactivation et à la phase initiale de latence. Or, l'atteinte de niveaux d'inactivation élevés (> 4 log, par exemple) est souvent contrôlée par ce phénomène. Une telle recherche équivaut à étudier plus en détails les causes de formation d'agrégats lors de la désinfection des eaux naturelles, en considérant non seulement les effets des caractéristiques de l'eau mais également l'influence des oxydants.

Par ailleurs, il est également recommandé de développer un test standardisé afin d'évaluer le degré d'interaction des organismes avec les particules dans les eaux naturelles. Ce paramètre pourrait potentiellement être déduit indirectement en analysant des courbes d'inactivation en eaux naturelles. Ce travail permettrait également de mettre à jour les connaissances sur l'occurrence d'agrégats dans les eaux naturelles, une information capitale pour le développement de modèles de risque compte tenu de la résistance accrue des agrégats microbiens.

Enfin, les conclusions de cette thèse pointent vers l'utilisation de modèles IDDF afin de calculer le CT_{effectif} des procédés de désinfection à l'échelle réelle. Pour le moment, il n'existe pas de technique simple de validation du CT_{effectif} obtenu par modélisation. Le développement d'une méthode simple et rapide de validation à pleine échelle du CT_{effectif} est le dernier frein limitant l'application généralisée des modèles IDDF pour le suivi réglementaire des procédés de désinfection des eaux potables.

Le domaine de la recherche sur la désinfection des eaux potables couvre plus d'un siècle de travaux. La complexité du sujet et l'absence de méthodologie standardisée font en sorte que le prochain siècle devrait encore amplement fournir matière à réflexion aux chercheurs dans ce domaine.

RÉFÉRENCES

- AIETA, E.M. ET J.D. BERG. 1986. A Review of Chlorine Dioxide in Drinking Water Treatment. *J. Am. Wat. Wks Assoc.* **78**(6):62-72.
- ALVAREZ, M.E. ET O'BRIEN, R.T. 1982. Mechanism of Inactivation of Poliovirus By Chlorine Dioxide and Iodine. *Appl. Env. Microbiol.*, **44**:1064.
- ARBUCKLE, T.E., HRUDEY, S.E., KRASNER, S.W., NUCKOLS, J.R., RICHARDSON, S.D., SINGER, P., MENDOLA, P., DODDS, L., WEISEL, C., ASHLEY, D.L., FROESE, K.L., PEGRAM, R.A., SCHULTZ, I.R., REIF, J., BACHAND, A.M., BENOIT, F.M., LYNBERG, M., POOLE, C. ET K. WALLER. 2002. Drinking Water - Assessing Exposure in Epidemiologic Studies to Disinfection By-products in Drinking Water: Report from an International Workshop. *Environmental Health Perspectives Supplement*, **110**(1):53-58.
- ASCHENGRAU, A., ZIERLER, S. ET A. COHEN. 1989. Quality of Community Drinking Water and the Occurrence of Spontaneous Abortion. *Arch. Environ. Health*, **44**:283-290.
- BARBEAU, B., L. BOULOS, R. DESJARDINS, J. COALLIER, M. PREVOST, ET D. DUCHESNE. 1997. A Modified Method for the Enumeration of Aerobic Spore-Forming Bacteria. *Can. J. Microbiol.*, **43**: 976-980.
- BARBEAU, B., L. BOULOS, R. DESJARDINS, J. COALLIER, ET M. PREVOST. 1998. Examining the Use of Aerobic Spore-Forming Bacteria to Assess the Efficiency of Chlorination. *Wat. Res.* **33**(13):2941-2948.
- BARBEAU, B., HUFFMAN, D., RIVARD, M., MYSORE, C. ET M. PREVOST. 2002. Impacts of Water Quality on the Efficacy of Disinfection In Natural Waters.

- In: Proceedings of the Water Quality Technology Conference – AWWA, Seattle, WA, USA.
- BELLAMY, W.D., FINCH, G. ET HAAS, C. 1998. Integrated Disinfection Design Framework. Rapport AWWARF # 335516, Denver, CO, USA.
- BERG, G. 1973. Reassessment of the Virus Problem in Sewage and in Surface and Renovated Waters. In : Progress in Water Technology, Pergamon Press, New York, NY, USA.
- BERG, J.D., ROBERTS, P.V. ET A. MATIN. 1986. Effect of Chlorine Dioxide on Selected Membrane Functions in *E. Coli*. *J. Appl. Bacteriol.*, **60**(3), 213-20.
- BERG, J.D. HOFF, J.C., ROBERTS, P.V. ET A. MATIN. 1988. Resistance of Bacterial Subpopulations to Disinfection by Chlorine Dioxide, *J. Am. Wat. Wks Assoc.*, **80**(9) :115-119.
- BERG, J.D., J.C. HOFF, P.V. ROBERTS, ET A. MATIN. 1985a. Disinfection resistance of *Legionella pneumophila* and *Escherichia coli* grown in continuous and batch culture. In : Water Chlorination: Chemistry : Environmental Impact and Health Effects. Vol. 5:603-613.
- BERG, J.D., P.V. ROBERTS, ET A. MATIN. 1985b. Growth of disinfection-resistant bacteria and simulation of natural aquatic environments in the chemostat. In : Water Chlorination : Chemistry, Environmental Impact and Health Effects. Vol. 4:1137-1147.
- BERMAN, D.E., W. RICE, ET J.C. HOFF. 1988. Inactivation of Particle Associated Coliforms by Chlorine and Monochloramine. *Appl. Environ. Microbiol.*, **54**:507-512.

- BERNARDE, M.A., SNOW, B.W., OLIVERI, V.P., ET DAVIDSON, B. 1967. Kinetics and Mechanisms of Bacterial Disinfection by Chlorine Dioxide. *Appl. Microbiol.*, **15** :257-265.
- BIELMEIER, S.R., BEST, D.S., GUIDICI, D.L. ET M.G. NAROTSKY. 2001. Pregnancy Loss in the Rat Caused by Bromodichloromethane. *J. Toxicol. Sci.*, **59** :309-315.
- BLOCK, J-C. 1982. Mechanisms of Microorganisms Inactivation by Oxidants. *Tech. & Sci. Municipales*. **11**:521-524.
- BLOOMFIELD, S.F. AND ARTHUR, M. 1994. Mechanisms of Inactivation and Resistance of Spores to Chemical Biocides. *J. Appl. Bact. Symposium Supplement*. **76**:91S-104S.
- BOARDMAN, G.D., ET O.J. SPROUL. 1977. Protection of Viruses during Disinfection by Adsorption to Particulate Matter. *Appl. Environ. Microbiol.*, **49**:1857-862.
- BOULOS, L., PREVOST, M., BARBEAU, B., COALLIER, J. ET R. DESJARDINS. 1999. LIVE/DEAD® BacLight™: Application of a New Rapid Staining Method for Direct Enumeration of Viable and Total Bacteria in Drinking Water. *J. Microbiol. Methods*, **37**:77-86.
- BOVE, F.J., FULCOMER, M.C., KLOTZ, J.B., ESMART, J., DUFFICY, E.M. ET J.E. SAVRIN. 1995. Public Drinking Water Contamination and Birth Outcomes. *Am. J. Epidemiol.*, **141** :850-862.
- BOX, G.E.P., W.G. HUNTER, ET J.S. HUNTER. 1978. Resolution III designs: Bicycle Examples. *Statistics For Experimenters*. Chapt.12, New York. John Wiley and Sons.

- BRAZIS, A.B., J.E. LESLIE, P.W. KABLER ET R.L. WOODWARD. 1958. The Inactivation of Spores of *Bacillus globigii* and *Bacillus anthracis* by Free Available Chlorine. *Jour. Applied Microbiol.*, **6**:338.
- BRIGANO, F.A.D., P.V. SCARPINO, S. CRONIER, ET M.L. ZINK. 1978. Effect of Particulates on Inactivation of *Enteroviruses* in Waters. Symposium on Wastewater disinfection. Cincinnati, OH, USEPA.
- BUTTERFIELD, C.T. ET E. WATTIE. 1946. Influence of pH and Temperature on The Survival of Coliforms and Enteric Pathogens when Exposed to Chloramines. *Public Health Rep.* **61**:157-192.
- BUTTERFIELD, C.T., WATTIE, E., MEGREGIAN, S., ET C.W. CHAMBERS. 1943. Influence of pH and Temperature on the Survival of Coliforms and Enteric Pathogens when Exposed to Free Chlorine. *Public Health Rep.*, **58**:1837-1866.
- CAMPER, A.K., LECHEVALLIER, M.W., BROADAWAY, S.C. ET G.A. MCFETERS. 1986. Bacteria Associated with Granular Activated Carbon Particles in Drinking Water. *Appl. Environ. Microbiol.*, **52**:434-458.
- CARLSON, G.F., WOODWARD, F. WENTWORTH D. ET O.J. SPROUL. 1968. Virus inactivation on clay particles in natural waters. *J. Wat. Poll. Control Fed.*, **40**:89-106.
- CCC - CHLORINE CHEMISTRY COUNCIL. 2003.
http://www.c3.org/chlorines_everyday_uses/newsflash10-25-98.html
- CHANG, S.L. 1944. Destruction of Microorganisms. . *J. Am. Wat. Wks Assoc.*, **36**:1192-1207.
- CHANG, S.L. 1961. Viruses, Amoebas, and Nematodes and Public Water Supplies. *J. Am. Wat. Wks Assoc.*, **53**(3):288-296.

- CHANG, S.L., ET G.M. FAIR. 1941. Viability and Destruction of the Cysts of *Entamoeba histolytica*. *J. Am. Wat. Wks Assoc.*, **33**:1705-1715.
- CHEN, Y.S.R., O.J. SPROUL, ET A.J. RUBIN. 1985. Inactivation of *Naegleria gruberi* Cysts by Chlorine Dioxide. *Wat. Res.*, **19**(6):783-789.
- CHICK, H. 1908. An Investigation of the Laws of Disinfection. *Journal of Hygiene*. **8**:92-157.
- CHURN, C.C., C.D. BOARDMAN, ET R.C. BATEN. 1984. The inactivation kinetics of H1-parvovirus by chlorine. *Wat. Res.*, **18**:195-203.
- CLANCY, J.L., HOLLNITZ, W.D. ET Z. TABIB. 1994. Commercial Labs: How Accurate Are They? *J. Am. Wat. Wks. Assoc.* **86**, 89-94.
- CLARK, R.M., E.W. RICE, B.K. PIERCE, C.H. JOHNSON, ET K.R. FOX. 1994. Effect of Aggregation on *Vibrio Cholerae* Inactivation. *Jour. Environ. Eng.*, **120**:875-887.
- CLARKE, N.A. 1962. Human Enteric Viruses in Water, Source, Survival, and Removability, International Conference on Water Pollution Research. Landar.
- CLARKE, N.A. ET P.W. KABLER. 1954. Inactivation of Purified *Coxsackie* Virus in Water by Chlorine. *Am. Jour. Hyg.*, **59**:119-127.
- CORONA-VASQUEZ, B., J.R. RENNECKER, ET B.J. MARINAS. 2000. Inactivation of *Cryptosporidium parvum* oocysts with ozone and free chlorine at low temperature. AWWA Water Quality Technology Conference. Salt Lake City, UT, USA.
- CORREA, A., STONE, A.E., WONG, L.-Y., LIN, B., ET M. LYNBERG. 1999. Assessing Exposure to Trihalomethanes in Tap Water in Studies of Pregnancy Outcome. *Am. J. Epidemiol.*, **149** :230.

- CRAMER, W.N., KAWATA, K. ET KRUSE, C.W. 1976. Chlorination and Iodination of *poliovirus* and *f2*. *J. Wat. Poll. Cntrl Fed.*, **48**(1):61-76.
- DEBEER, D., P. STOODLEY, ET Z. LEWANDOWSKI. 1996. Liquid Flow and Mass transport in Heterogeneous Biofilms. *Wat. Res.*, **30**(11):2761.
- DODDS, L., KING, W., WOOLCOTT, C. ET J. POLE. 1999. Trihalomethanes in Public Water Supplies and Adverse Birth Outcomes. *Epidemiology*, **10** :233-237.
- DORE, M. 1989. Chimie des oxydants et traitement des eaux, Technique et documentation-Lavoisier. Paris, France.
- DRIEDGER, A., RENNECKER, J.L., MARINAS, B.J. 2001. Inactivation of *Cryptosporidium parvum* Oocysts with Ozone and Monochloramine at Low Temperature. *Wat. Res.*, **35**(1) :41-48.
- DRIKS, A. 1999. *Bacillus subtilis* spore coat. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **63**:1-20.
- DUCHESNE, D. ET P. LAFRANCE. 1987. L'emploi du bioxide de chlore à Ville de Laval. *Sciences et techniques de l'eau*. **20**(1) :12-19.
- ENGELBRECHT, R.S., M.J. WEBER, B.L. SALTER, B.L., ET C.A. SCHMIDT. 1980. Comparative Inactivation of Viruses by Chlorine. *Appl. Environ. Microbiol.*, **40**(10): 1051-1061.
- FAIR, G.M., J.C. MORRIS, ET S.L. CHANG. 1947. The Dynamics of Water Chlorination. *Jour. NEWWA*, **61**:285.
- FAIR, G.M., J.C. MORRIS, S.L. CHANG, I. WEIL, ET R.P. BURDEN. 1948. The Behavior of Chlorine as a Water Disinfectant. *J. Am. Wat. Wks Assoc.*, **40**:1051-1061.

- FAUST, S.D. ET O.M. ALY. 1998. Chemistry of Water Treatment. 2nd ed. Ann Arbor Press.
- FINCH, G.R., ET K. CHOE. 1999a. Using Bacillus Spores as Surrogate for Ozone Inactivation of *Cryptosporidium*. In Proceedings of the 14th Ozone world Congress. Dearborn, Mich.
- FINCH, G.R., L.R.J. LIYANAGE, L.L. GYÜREK, J.S. BRADBURY, ET M. BELOSEVIC. 1999b. Synergistic Effects of Multiple Disinfectants. AWWARF Report.
- FINCH, G.R. ET H. LI. 1999c. Inactivation of *Cryptosporidium* at 1°C Using Ozone or Chlorine Dioxide. *Oz. Sci. Eng.*, **21**:477-486.
- FINCH GR, HAAS CN, OPPENHEIMER JA, GORDON G, TRUSSELL RR. 2001. Design Criteria for ozone Inactivation of *Cryptosporidium* in Drinking Water. *Ozone Sci. Eng.*, **23**(4):259-84.
- FLOYD, R., D.G. SHARP, ET J.D. JOHNSON. 1979. Inactivation by Chlorine of Single Poliovirus Particles. *Wat. Environ. Sci. Technol.*, **13**:438-442.
- GALLAGHER, M.D., NUCKOLS, J.R., STALLONES, L. ET D.A. SAVITZ. 1998. Exposure to Trihalomethanes and Adverse Pregnancy Outcomes. *Epidemiology*, **9**:484-489.
- GAUTHIER, V., B. BARBEAU, R. MILLETTE, J.C. BLOCK, ET M. PREVOST. 2001. Suspended Particles in the Drinking Water of Two Distribution Systems. *Wat. Sci. Technol.: Water Supply*, **1**(4):237-245.
- GEVECKER GRAVES, C., MATANOSKI, G.M., TARDIFF, R.G., KERGER, B.D., SCHMIDT, C.E. ET D.J. PAUSTENBACH. 2000. Assessment of Airborne

- Exposure to Trihalomethanes from Tap Water in Residential Showers and Baths. *Risk Anal.*, **20** :637-651.
- GHANDABARI, E.H. ET AL. 1983. Reactions of chlorine and chlorine dioxide with free fatty acids, fatty acid esters and triglycerides. In : Water chlorination : Environmental Impact and Health Effects, vol. 4, Ann Arbor Sci. Publ., Ann Arbor, MI, USA.
- GRANT S.B. 1995. Inactivation Kinetics of viral aggregates. *J. Environ. Eng.*, **121**(4) :311-319.
- GREEN, D.E., ET P.K. STUMPF. 1946. The Mode of Action of Chlorine. *J. Am. Wat. Wks Assoc.*, **38**: 1301.
- GYÜREK, L.L., G.R. FINCH, ET M. BELOSEVICH. 1997. Modeling Chlorine Inactivation Requirements of *Cryptosporidium Parvum*. *Environ. Technol.*, **123**(9): 865-875.
- GYÜREK, L.L., ET G.R. FINCH. 1998. Modeling Water Treatment Chemical Disinfection Kinetics. *J. Environ. Eng.*, **124**(9):783-793.
- HAAS, C.N. ET R.S. ENGELBRECHT. 1980. Physiological Alterations of Vegetative Microorganisms Resulting From Aqueous Chlorination. *J. Wat. Poll. Contr. Fed.*, **52**:1976-1989.
- HAAS, C.N., ET M.A. ZAPKIN. 1981. Water Chlorination: Environmental Impact and Health Effects, vol. 2, Ann Arbor Sci. Publ., Ann Arbor, MI, USA.
- HAAS, C.N., ET B. KARRA. 1984a. Kinetics of Microbial Inactivation by Chlorine – I Review of Results in Demand-Free Systems. *Wat. Res.*, **18**(11):1443-1449.
- HAAS, C.N., ET B. KARRA. 1984b. Kinetics of Microbial Inactivation by Chlorine – II Kinetics in the presence of Chlorine i Demand. *Wat. Res.*, **18**(11):1451-1454.

- HAAS, C.N. ET D. BRNCICH. 1986. Influence of Sodium, Potassium, and Lithium on Hypochlorite Solution Equilibria., Water Chlorination: Environmental Impact and Health Effects, vol. 5, p 775-782, Ann Arbor Sci. Publ., Ann Arbor, MI, USA.
- HAAS, C.N. ET J. JOFFE. 1994. Disinfection under dynamic conditions: modification of Hom model for decay. *Environ. Sci. Tech.* **28**:1367-1369.
- HAAS, C.N., JOFFE, J., HORNBERGER, J.C., ANMANGANDLA, U., HEATH, M., ET JACANGELO, J. 1995. Development and Validation of Rational Design Methods of Disinfection, AWWA Research Foundation, Denver, CO.
- HARM, W. 1980. Biological Effects of Ultra Violet Radiation. Cambridge University Press, Cambridge, U.K.
- HAUCHMAN, F.S., NOSS, C.I.; OLIVIERI, V.P. 1986. Chlorine Dioxide Reactivity with Nucleic Acids. *Wat. Res.*, **20**(3):357-361 .
- HEJKAL, T.W. ET AL. 1979. Survival of Poliovirus Within Organic Solids During Chlorination. *Appl. Environ. Microbiol.*, **38**:114-116.
- HERSON, D.S., B. MCGONOGLE, M.A. PAYER, ET K.H. BAKER. 1987. Attachment as a Factor in the Protection of *Enterobacter cloacae* from Chlorination. *Appl. Environ. Microbiol.*, **53**:1178-1180.
- HIBLER, C.P., C.M. HANCOCK, L.M. PERGER, J.G. WEGRZYN, ET K.D. SWABBY. 1987. Inactivation of *Giardia* Cysts with Chlorine at 0.5°C to 5.0°C. AWWA Research Foundation, Denver, CO.
- HO, L., NEWCOMBE, G. CROUÉ, J.-P. ET G. KLASS. 2000. The Effect of NOM Character on the Ozonation of MIB and Geosmin. In: Proceedings of the Water Quality Technology Conference – American Water Works Association, Salt Lake City, UT, USA.

- HOEHN, R.C. 1992. Chlorine Dioxide Use in Water Treatment: Key Issues. *Chlorine Dioxide: Drinking Water Issues Second International Symposium*. Proceedings. Houston, TX, USA.
- HOFF, J.C. 1978. The relationship of Turbidity to Disinfection of Potable Water, in *Evaluation of the Microbiology Standard for Drinking Water*. Washington D.C. Hendricks, C.W. ed. 103-117. USEPA.
- HOFF, J.C. ET E.W. AKIN. 1986. Microbial Resistance to Disinfectants: Mechanisms and Significance. *Environ. Health Perspect.*, **60**:7-13.
- JUNLI, H., L. WANG, R. NENQI, L.X. LI, F. SUN RON ET G. YANG. 1997. Disinfection Effect of Chlorine Dioxide on Viruses, Algae and Animal Planktons. *Wat. Res.*, **31**(3)455-460.
- JOLIS, D. 2002. The Effect of Storage and Lag Time on MS2 Bacteriophage Susceptibility to Ultraviolet Radiation. *Water Environ Res.*, **74**(6):516-520.
- KANEKO, M. ET H. IGARASHI. 1983. Effects of Suspended Solids on Inactivation of Poliovirus by Chlorine, *Water Sci. Tech.*, **15** :137-143.
- KAWAMURA K., KANEKO M., HIRAT, T. ET K. TAGUCHI. 1986. Microbial indicators for the efficiency of disinfection processes. *Wat. Sci . Tech.*, **18**:175-183.
- KIM, B.R., ANDERSON, J.E., MUELLER, S.A., GAINES, W.A.ET A.M. KENDALL. 2002. Literature review— Efficacy of various disinfectants against *Legionella* in water systems. *Water Research*, **36**:4433–4444.

- KING, W.D., DODDS, L. ET A.C. ALLEN. 2000. Relation between Stillbirth and Specific Chlorination By-products in Public Water Supplies. *Environ. Health Perspective*, **108** :883-886.
- KLOTZ, J.B. ET L.A. PYRCH. 1999. Neural Tube Defects and Drinking Water Disinfection By-products. *Epidemiology*, **10** :383-390.
- KNOX, W.E. STUMPF, P.K., GREEN, D.E. ET V.H. AUERBACH. 1948. The Inhibition Of Sulfhydryl Enzymes As The Basis of the Bacterial Action of Chlorine. *J. Bacteriol.*, **55** :451-458.
- KRAMER, M.D., LYNCH, C.F., ISACSON, P. ET J.W. HANSON. 1992. The Association of Waterborne Chloroform with Intrauterine Growth Retardation. *Epidemiology*, **3** :407-413.
- KULIKOVSKI, A., PANKRATZ, H.S. ET H.L. SADOFF. 1975. Ultrastructural and chemical changes in spores of *Bacillus cereus* after action of disinfectants. *J. Appl. Bacteriol.*, **38** :39-46.
- KUO, H.-W., CHIANG, T.-F., LO, I.-I., LAI, J.-S., CHAN C.-C. ET J.-D. WANG. 2001. Weight of Evidence for an Association between Adverse Reproductive and Developmental Effects and Exposure to Disinfection By-products: A Critical Review. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, **34**(2) :103-124.
- KUO, H.W., CHIANG, T.F., LO, II., LAI, JS, CHAN, C.C. ET J.D. WANG. 1998. Estimates of Cancer Risk from Chloroform Exposure during Showering in Taiwan. *The Science of The Total Environment*, **218**(1):1-7.
- LEAHY, J.G. 1985. Inactivation of *Giardia Muris* by Chlorine and Chlorine Dioxide. M.S. Thesis, Ohio State University.

- LEAHY, J.G., A.G. RUBIN, ET O.J. SPROUL. 1987. Inactivation of *Giardia* Cysts by Free Chlorine. *Appl. Environ. Microbiol.*, **53**(7): 1448-1453.
- LECHEVALLIER, M.W., C.D. CAWTHON, AND R.G. LEE. 1988a. Factors Promoting Survival of Bacteria in Chlorinated Water Supplies. *Appl. Environ. Microbiol.*, **54**(3): 649-654.
- LECHEVALLIER, M.W., C.D. CAWTHON, AND R.G. LEE. 1988b. Inactivation of Biofilm Bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, **54**: 2492-2499.
- LECHEVALLIER, M.W., C.D. CAWTHON, AND R.G. LEE. 1988c. Mechanisms of Bacterial Survival in Chlorinated Drinking Water. *Water Science and Technology*. **20**: 145.
- LECHEVALLIER, M.W., T.M. EVANS, AND R.J. SEIDLER. 1981. Effect of Turbidity on Chlorination Efficiency and Bacterial Persistence in Drinking Water. *Appl. Environ. Microbiol.*, **42**(1): 159-167.
- LECHEVALLIER, M.W., T.S. HASSENAUER, A.K. CAMPER, AND G.A. MCFETERS. 1984. Disinfection of Bacteria Attached to Granular Activated Carbon. *Appl. Environ. Microbiol.*, :918-923.
- LIYANAGE, R.J.L., G. FINCH, ET M. BELOSEVIC. 1997a. Effect of Aqueous Chlorine and Oxychlorine Compounds on *Cryptosporidium parvum* Oocysts. *Environ. Sci. Technol.*, **31**:1992-1994.
- LIYANAGE, R.J.L., G. FINCH, ET M. BELOSEVIC. 1997b. Sequential Disinfection of *Cryptosporidium Parvum* by Ozone and Chlorine Dioxide. *Oz. Sci. Eng.*, **19**:409-423.

- LOCAS, A. 2002. Évaluation de l'origine des coliformes totaux à la station de pompage du réservoir McTavish, Montréal (Canada). Mémoire de Maîtrise. École Polytechnique de Montréal. 159 p.
- MAGNUS, P., JAAKKOLA, J.J.K., SKRONDAL, A., ALEXANDER, J., BECHER, G., KROGH, T. ET E. DYBING. 1999. Water Chlorination and Birth Defects. *Epidemiology*, **10** :513-517.
- MAJUMDAR, B. CECKLER, W.H. ET O.J. SPROUL. 1973. Inactivation of *Polioviruses* in Water by Ozonation. *J. Wat. Poll. Control. Fed.*, **45**(12) :2433-2443.
- MARKS, H.C., O. WYSS, ET F.B. STRANDKOV. 1945. Studies on the Mode of Action of Compounds Containing Available Chlorine. *J. Bacteriol.*, **49**: 299.
- MASSCHELEIN, W.J. 1985. Experience With Chlorine Dioxide in Brussels, Part 3 : Operational Case Studies, *J. Am. Wat. Wks Assoc.*, **77**(1):73-80.
- MASCHELEIN, W.J. 1989. Determination of Residual Ozone or Chlorine Dioxide in Water With ACVK – an Updated Version, *Oz. Sci. & Eng.*, **2**:209-215.
- MASSCHELEIN, W.J. 1992. Unit Processes in Drinking Water Treatment. Marcel Dekker Inc. New York.
- MOORE, B.E., B.P. SAGIK, ET JR. J.F. MALINA. 1975. Viral Association With Suspended Solids. *Wat. Res.*, **9**:197-203.
- MORIN, P., A. CAMPER, W. JONES, D. GATEL, AND J.C. GOLDMAN. 1996. Colonization and Disinfection of Biofilms Hosting Coliform-Colonized Carbon Fines. *Appl. Environ. Microbiol.*, **62**(12):4428-4432.

- MORIN, P., V. GAUTHIER, S. SABY, ET J.C. BLOCK. 1999. Bacterial Resistance to Chlorine Through Attachment to Particles and Pipe Surfaces in Drinking Water Systems. *Special Publication of the Royal Society of Chemistry*. 20:171-242.
- MORISSETTE, C., M. PREVOST, ET B. LANGLAIS. 1996. Impact de Différents Traitements d'eau Potable sur la Consommation en Bioxyde de Chlore et sur la Formation de Sous-Produit d'oxydation. *Aqua*. 45(5):232-243.
- MORRIS, J.C. 1966. The Mechanism of the Hydrolysis of Chlorine. *Jour. American Chemical Society*, 68: 1692.
- MYRE, I. 1999. Mesure des CT d'inactivation des bactéries sporulantes aérobies par oxydation avec le bioxyde de chlore. Mémoire de maîtrise. École Polytechnique, 119 p.
- MYSORE, C., LEPARC, J., BARBEAU, B., DOW, S., HERNANDEZ, M., AMY, G. ET B. MARINAS. 2003. Impacts of Water Quality on the Inactivation of Bacterial and Viral Surrogates. American Water Works Research Foundation, Denver, CO, USA.
- NARKIS, N.A., R. ARMON, R. OFFER, F. ORSHANSKY, ET E. FRIEDLAND. 1995. Effect of Suspended Solids on Wastewater Disinfection Efficiency by Chlorine Dioxide. *Wat. Res.*, 29(1):227-237.
- NOSS, C.I., HAUCHMAN, F. S. ET V.P. OLIVIERI. 1986. Chlorine Dioxide Reactivity with Proteins. *Wat. Res.*, 20(3) :351-356.
- ODOM, R., REGLI, S., MESSNER, M., CROMWELL, J. ET M. JAVDAN. Benefit-Cost Analysis of Stage 1 D/DBP Rule. *J. Am. Wat. Wks. Assoc.*, 91(4) :137-147.

- OLIVERI, V.P. ET AL., 1985. Mode of action of chlorine dioxide on selected viruses. In : Water chlorination : Environmental Impact and Health Effects, vol. 5, Ann Arbor Sci. Publ., Ann Arbor, MI.
- OLIVERI, V.P., KRUSÉ, C.W., HSU Y-C., GRIFFITHS, A.C. ET KAWATA, K. 1975. The comparative mode of action of chlorine, bromine, iodine on f2 bacterial virus. In: Disinfection: water and wastewater. Ann Arbor Publishers, Ann Arbor, MI, 425 p.
- QUÉBEC (Gouvernement du), 2001. Règlement sur la Qualité de l'Eau Potable. Loi sur la Qualité de l'Environnement. L.R.Q., c. Q-2, article 31.
- RAV-ACHA, CH. 1984. The reactions of chlorine dioxide with aquatic organic materials and their helath effects. *Wat. Res.*, **18**:1329-1341.
- RENNECKER, J.L., A.J. DRIEDGER, S.A. RUBIN, ET B. MARINAS. 2000. Synergy in sequential inactivation of *Cryptosporidium parvum* with ozone/free chlorine and ozone/ monochloramine. *Wat. Res.*, **34**(17)4121-4130.
- RICE E.W., FOX, K.R., MILTNER, R.J., LYTLE, D.A. ET C.H. JOHNSON. 1996. Evaluating plant performance with endospores. *J. Am. Wat. Wks. Assoc.*, **88**:122-130.
- RICE, E.W., FOX, K.R., MILYNER, R.J., LYLTE, D.A. ET C.H. JOHNSON. 1994. A microbial surrogate for evaluating treatment efficiency. In: *Proceedings of the Water Quality Technology Conference*, AWWA, San Francisco, CA, 2035-2045.
- RIDGWAY, H.F., ET B.H. OLSON. 1982. Chlorine resistance patterns of bacteria from two drinking water distribution systems. *Appl. Environ. Microbiol.*, **44**(4):972.
- ROLLER, S.D., OLIVERI, V.P. ET K. KAWATA. 1980. Mode of Bacterial Inactivation by Chlorine Dioxide. *Wat. Res.*, **14** :635-641.

- ROOK, J.J. 1974. Formation Of Haloforms During Chlorination Of Natural Waters. *Water Treatment and Examination*, 23(2) :234-243.
- ROSS, W.R., J. VAN LEEUWEN, ET W.O.K. GRABOW. 1975. Studies on Disinfection and Chemical Oxydation with Ozone and Chlorine in Water Reclamation. 2nd International Ozone Symposium. Montreal, Ca.
- RUBIN, A.J. 1988. Factors Affecting the Inactivation of Giardia Cysts by Monochloramine and Comparison with Other Disinfectants. Conference on Current Water Research on Drinking Water. Cincinnati, Ohio, US, EPA.
- RUBIN, A.J., D.P. EVERS, C.M. EYMAN, ET E.L. JARROLL. 1989. Inactivation of Gerbil-Cultured Giardia lamblia Cysts by Free Chlorine. *Appl. Environ. Microbiol.*, 43(1): 250-251.
- RUBIN, A.J., J.P. ENGEL, ET O.J. SPROUL. 1983. Disinfection of anaerobic cysts in water with free chlorine. *J. Wat. Poll. Cntrl Fed.* 55:1174-1182.
- RUFFELL, K.M, RENNECKER, J.L., MARINAS, B.J. 2000. Inactivation of *Cryptosporidium parvum* Oocysts with Chlorine Dioxide. *Wat. Res.*, 34(3) :868-876.
- SABY S., I. SIBILLE, L. MATHIEU, J.L. PAQUIN, ET J.C. BLOCK, 1997. Influence of water chlorination on the counting of bacteria with DAPI. *Appl. Environ. Microbiol.*, 63(4) :1564.
- SAFE DRINKING WATER COMMITTEE, BOARD ON TOXICOLOGY ET ENVIRONMENTAL HEALTH HAZARDS, ASSEMBLY OF LIFE SCIENCES, NATIONAL RESEARCH COUNCIL. 1977. Drinking water and health. National Academy Press,. Washington D.C. :

- SAVITZ, D.A., ANDREWS, K.W. ET L.M. PASTORE. 1995. Drinking Water and Pregnancy Outcome in Central North Carolina: Source, Amount, and Trihalomethane Levels. *Environ. Health Perspect.*, **103** :592-596.
- SCARPINO, P.V., G. BERG, S.L. CHANG, D. DAHLING, ET M. LUCAS. 1972. A Comparative Study of the Inactivation of Viruses in Water by Chlorine. *Wat. Res.*, **6**: 959-965.
- SELLECK, R.E., SAUNIER, R.M ET H.F. COLLINS. 1978. Kinetics of Bacterial Deactivation with Chlorine. *J. Env. Eng.*, **104**:1197-1212.
- SEVERIN, B.F., SUIDAN, M.T., ET R.S. ENGELBRECHT. 1984. Series-Event Kinetic model for chemical Disinfection. *J. Env. Eng.*, **110**(2):430-439.
- SHIH, K.L. ET J. LEDERBERG. 1976. Chloramine mutagenesis in *Bacillus subtilis*. *Science*, **192** :1141-1143.
- SOBSEY, M.D. 1989. Inactivation of Health Related Microorganisms in Water by Disinfection Processes. *Water Science and Technology*, **21**(3): 179-195.
- SPROUL, OJ; CHEN, YSR; ENGEL, JP; RUBIN, A.J. 1983. Comparison on chlorine and chlorine dioxide for the inactivation of an amoebic cyst. *Environ. Technol. Lett.*, **4**(8-9) :335-342.
- STAGG, C.H., C. WALLIS, ET C.H. WARD. 1977, Inactivation of Clay-Associated Bacteriophage MS-2 by Chlorine. *Appl. Environ. Microbiol.*, **33**(2):385-391.
- STEWART, M.H., ET B.H. OLSON. 1992. Physiological Studies of Chloramine Resistance Developed by *Klebsiella pneumoniae* Under Low-Nutrient Growth Conditions *Appl. Environ. Microbiol.*, **58**(9):2918-2927.

- STEWART, M.H., WOLFE, R.L., ET E.G. MEANS. E.G. 1990. Assessment of the Bacteriological Activity Associated With Granular Activated Carbon Treatment of Drinking Water *Appl. Environ. Microbiol.*, **56**:3822-3829.
- STRINGFELLOW, W.T., K. MALLON, ET F.A. DIGIANO. 1993. Enumerating and Disinfecting Bacteria Associated With Particles Released From GAC Filter-absorbers. *J.Am. Wat. Wks Assoc.*, **85**:70-80.
- SUGAM, R. ET G.R. HELZ. 1976. Apparent ionization constant of hypochlorous acid in seawater. *Appl. Environ. Microbiol.*, **39** :530-534.
- SWAN, S.H., WALLER, K., HOPKINS, B., WINDHAM, G., FENSTER, L., SCHAEFER, C. ET R.R. NEUTRA. 1998. A Prospective Study of Spontaneous Abortion: Relation to Amount and Source of Drinking Water Consumed in Early Pregnancy. *Epidemiology*, **9** :126-133.
- TOENNIESSEN, G.H. ET J.D. JOHNSON. 1970. Heat shocked *Bacillus subtilis* spores as an indicator of virus disinfection. *J. Am. Wat. Wks. Assoc.*, **62**:589-597.
- USEPA. 1989. Guidance Manual for the compliance with the filtration and disinfection requirements for public water systems using surface waters. <http://www.epa.gov/safewater/mdbp/implement.html>
- USEPA. 1999. Guidance Manual: Alternative disinfectants and oxidants. EPA 815-R-99-014, <http://www.epa.gov/safewater/mdbp/implement.html>
- USEPA. 2001. Male-specific (f+) and Somatic Coliphage in water by single agar layer (SAL) procedure. EPA 821-R-01-029.
- USEPA. 2002. Long Term 2 Surface Water Treatment Rule. 40 CFR, parts 141 and 142, <http://www.epa.gov/safewater/openc.html>

- VENKOBACHAR, C., IYENGAR, L. ET A.V.S.P. RAO. 1977. Mechanism of disinfection : effect of chlorine on cell membrane functions. *Wat. Res.*, 11 :727-729.
- VON GUNTEN, U. 2003. Communication personnelle.
- WALLER, K., SWAN, S.H., DELORENZE, G. ET B. HOPKINS. 1998. Trihalomethanes in Drinking Water and Spontaneous Abortion. *Epidemiology*, 9 :134-140.
- WATSON, H.E. 1908. A note on the variation of the rate of disinfection with change in the concentration of the disinfectant. *Journal of Hygiene*. 8 :536-542.
- WERDEHOFF, K.S., ET P.C. SINGER. 1987. Chlorine Dioxide Effects on THNFP, TOXFP and the Formation of Inorganic By-Products. *J. Am. Wat. Wks Assoc.*, 79(9):107-113.
- WHITE, G.C. 1992. The Handbook of Chlorination and Alternative Disinfectants. 3th ed. Van Nostrand Reinhold. New York.
- WHITE, G.C. 1999. Handbook of Chlorination and Alternative Disinfectants. Van Nostrand Reinhold. New York.
- WINDHAM, C., WALLER, K., ANDERSON, M., FENSTER, L., MENDOLA, P., ET SWAN, S. 2003. Chlorination by-Products in Drinking Water and Menstrual Cycle Function, *Environ. Hlth Persp.*, doi:10.1289/ehp.5922.
- WYSS, O. 1962. Disinfection by chlorine: theoretical aspect, *Water Sew. Works*, 109, R155.
- YANG, C.-Y., CHENG, B.-H., TSAI, S.-S., WU, T.-N., LIN, M.-C. ET K.-C. LIN. 2000. Association between Chlorination of Drinking Water and Adverse Pregnancy Outcome in Taiwan. *Environ. Health Perspect.*, 108 :765-768.

- YONGYI, W., J. ZHANPENG, ET H. GUYXIASHENG. 1995. Studies on Bactericidal and Algaecidal Ability of Chlorine Dioxide. *Water Treatment*, 10:347-352.
- YOUNG, S.B. ET SETLOW, P. 2003. Mechanisms of Killing of *Bacillus subtilis* Spores by Hypochlorite and Chlorine Dioxide. *J. App. Microbiol.*, 95(1):54.
- ZOBELL, C.E. 1943. The Effect of Solid Surfaces upon Bacterial Activity. *Journal of Bacteriol.*, 46:39-50.

ANNEXE A

COURBES D'INACTIVATION DES SPORES DE *B. SUBTILIS* PAR LA CHLORATION EN EAUX SYNTHÉTIQUES

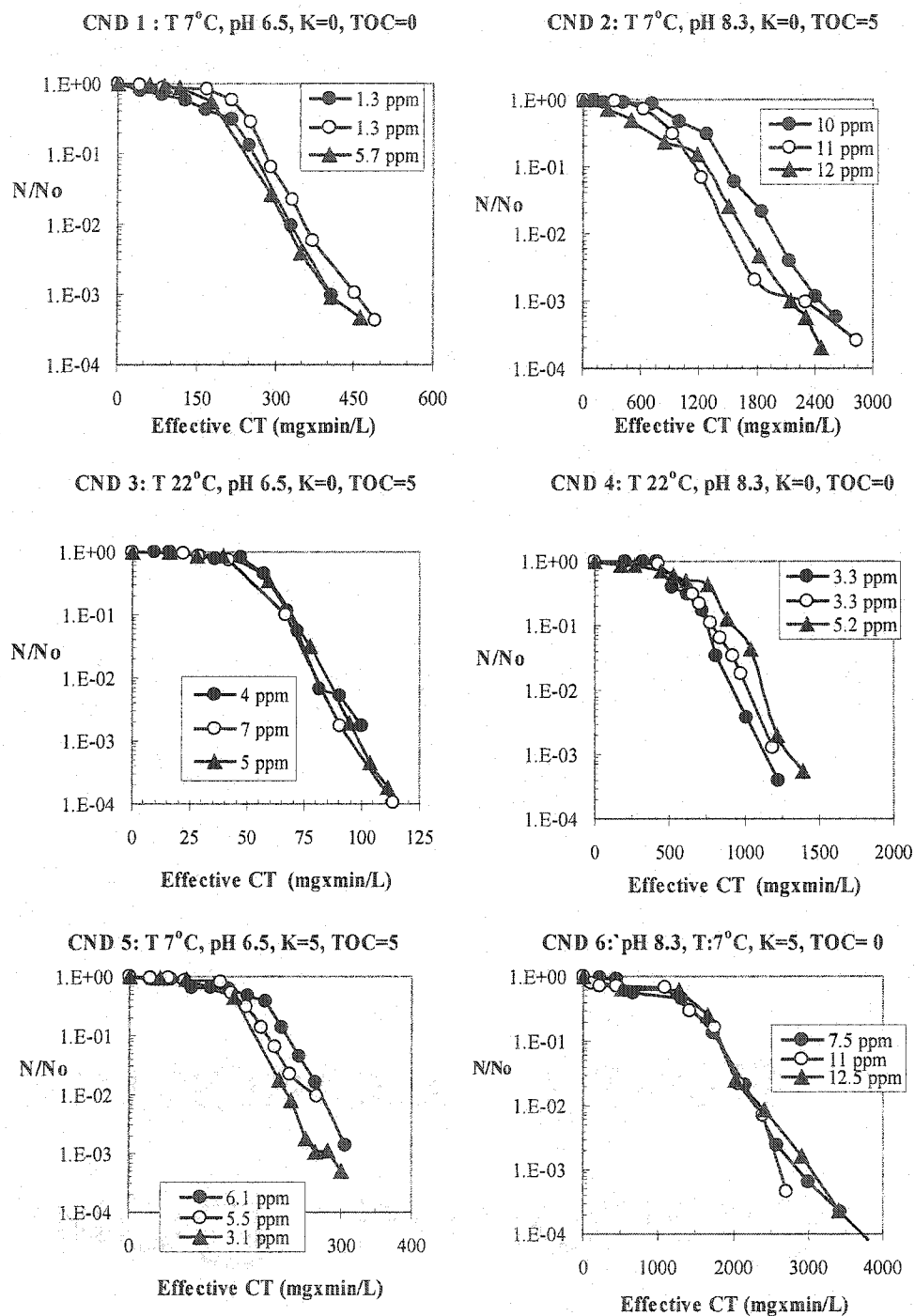


Figure A-1: Inactivation des spores de *B. subtilis* par le chlore pour différents types d'eau. Voir Tableau 3-2 pour la description des eaux.

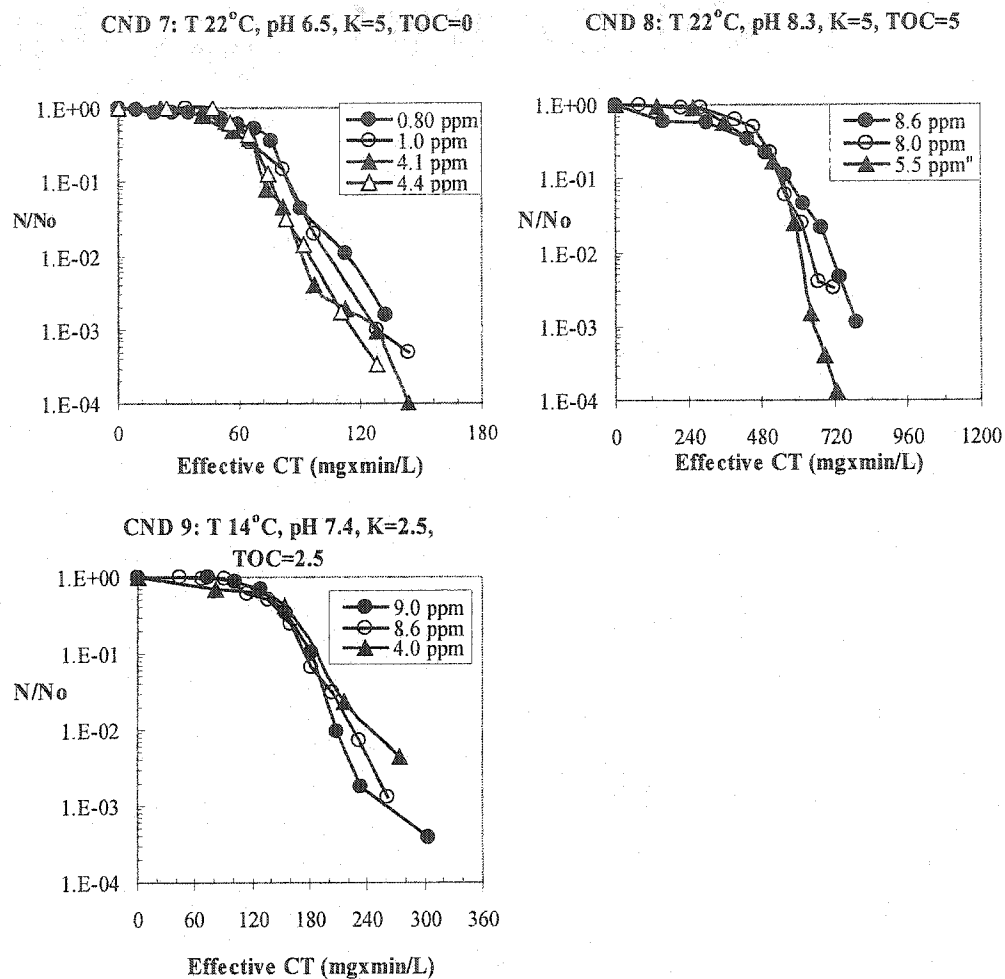


Figure A-2: Inactivation des spores de *B. subtilis* par le chlore pour différents types d'eau. Voir Tableau 3-2 pour la description des eaux.

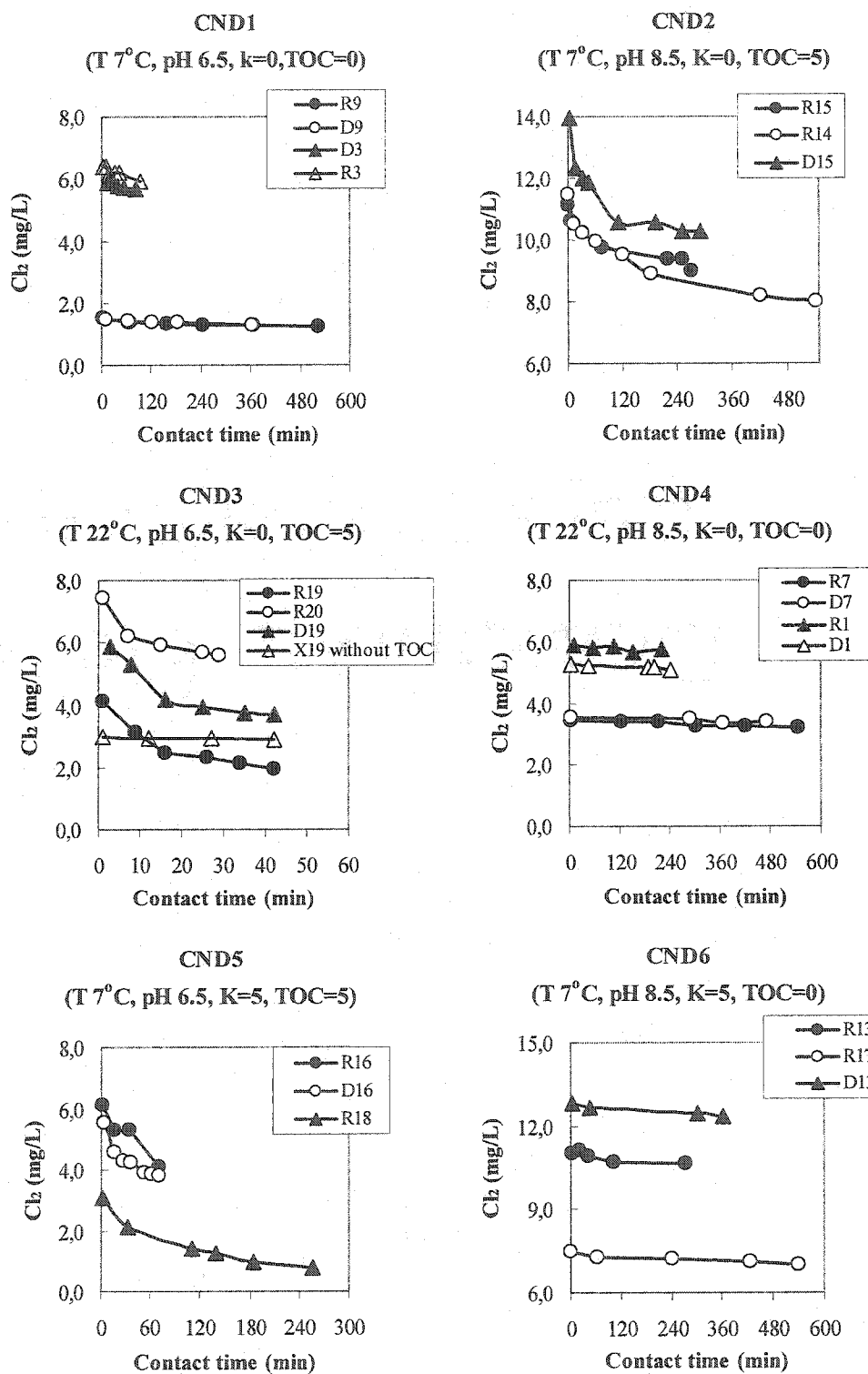


Figure A-3: Courbes de décroissance du chlore libre durant les essais (Cnd 1 à 6)

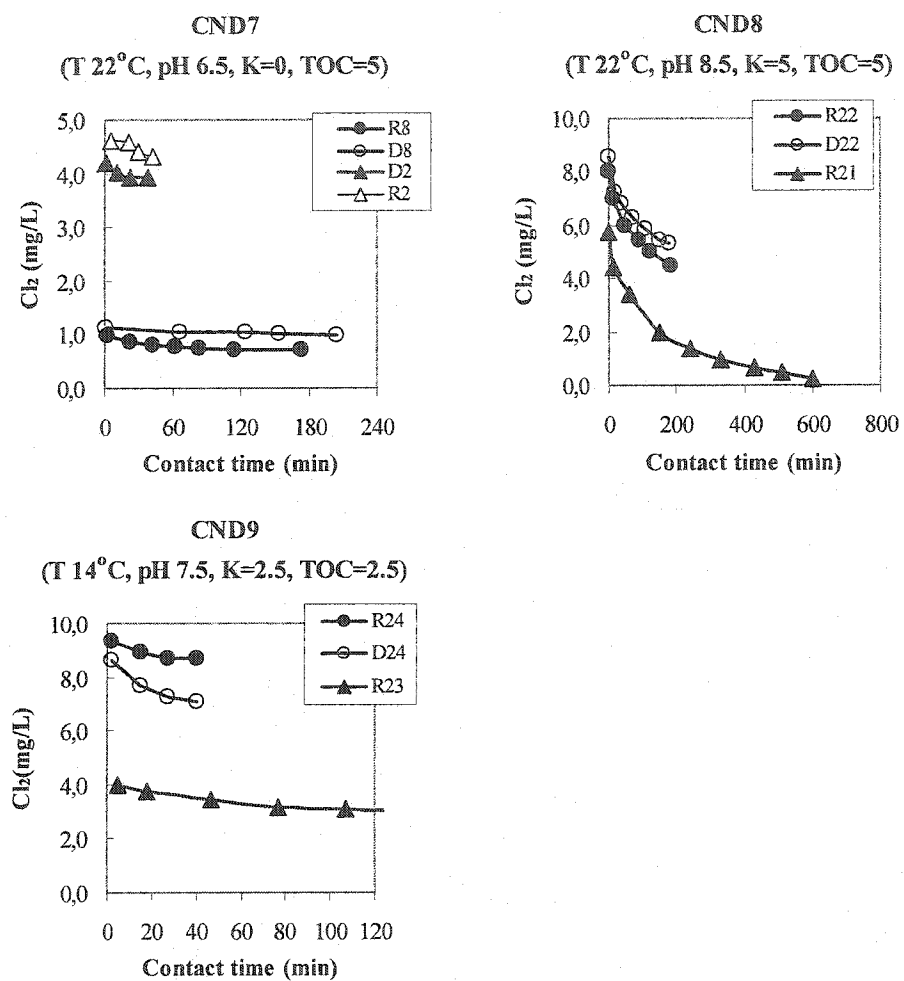


Figure A-4: Courbes de décroissance du chlore libre durant les essais (Conditions 7 à 9)

ANNEXE B

COURBES D'INACTIVATION DES SPORES DE *B. SUBTILIS* PAR LE BIOXYDE DE CHLORE EN EAUX SYNTHÉTIQUES

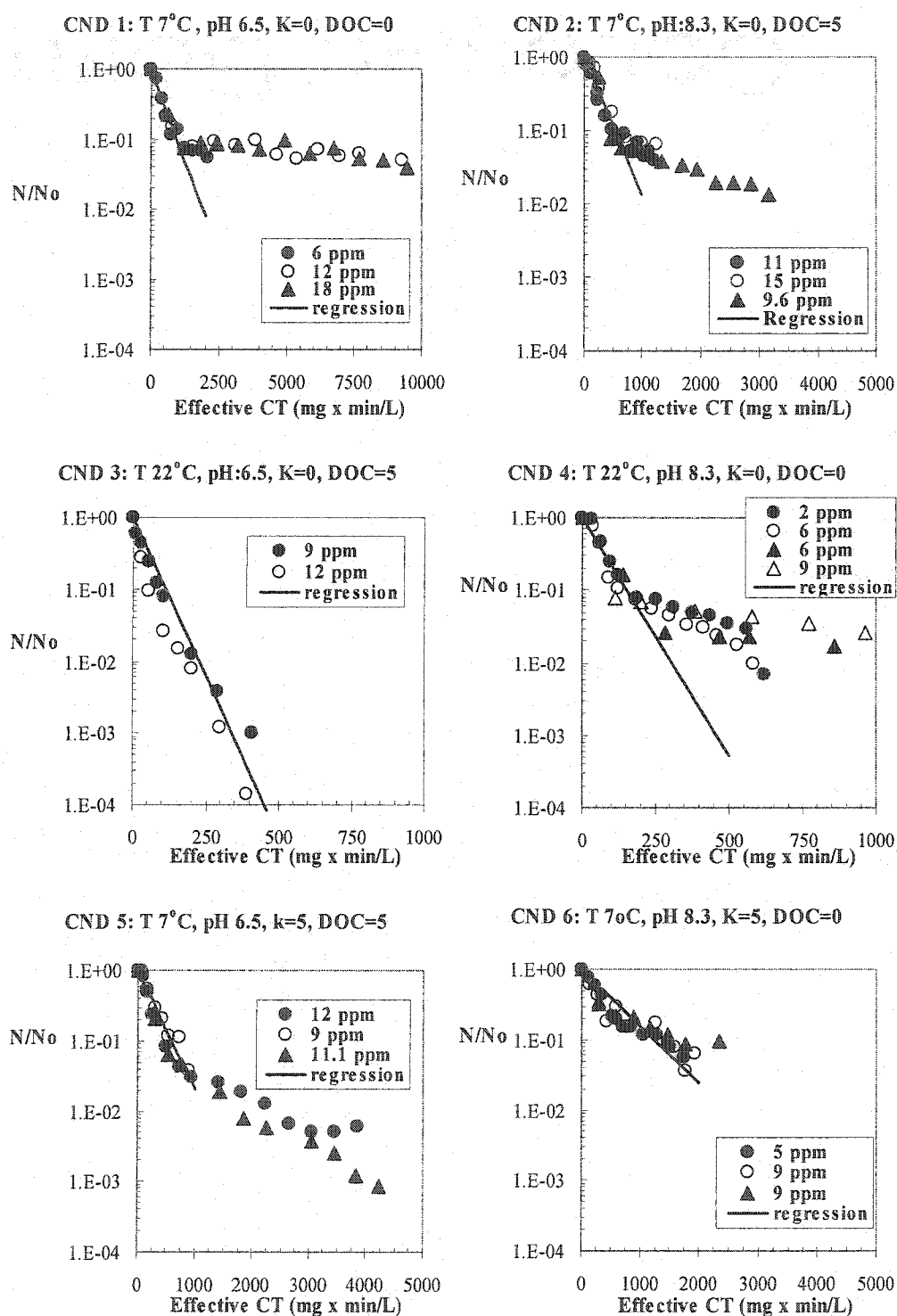


Figure B-1: Inactivation des spores de *B. subtilis* par le bioxyde de chlore pour différents types d'eau. Voir Tableau 3-2 pour la description des eaux.

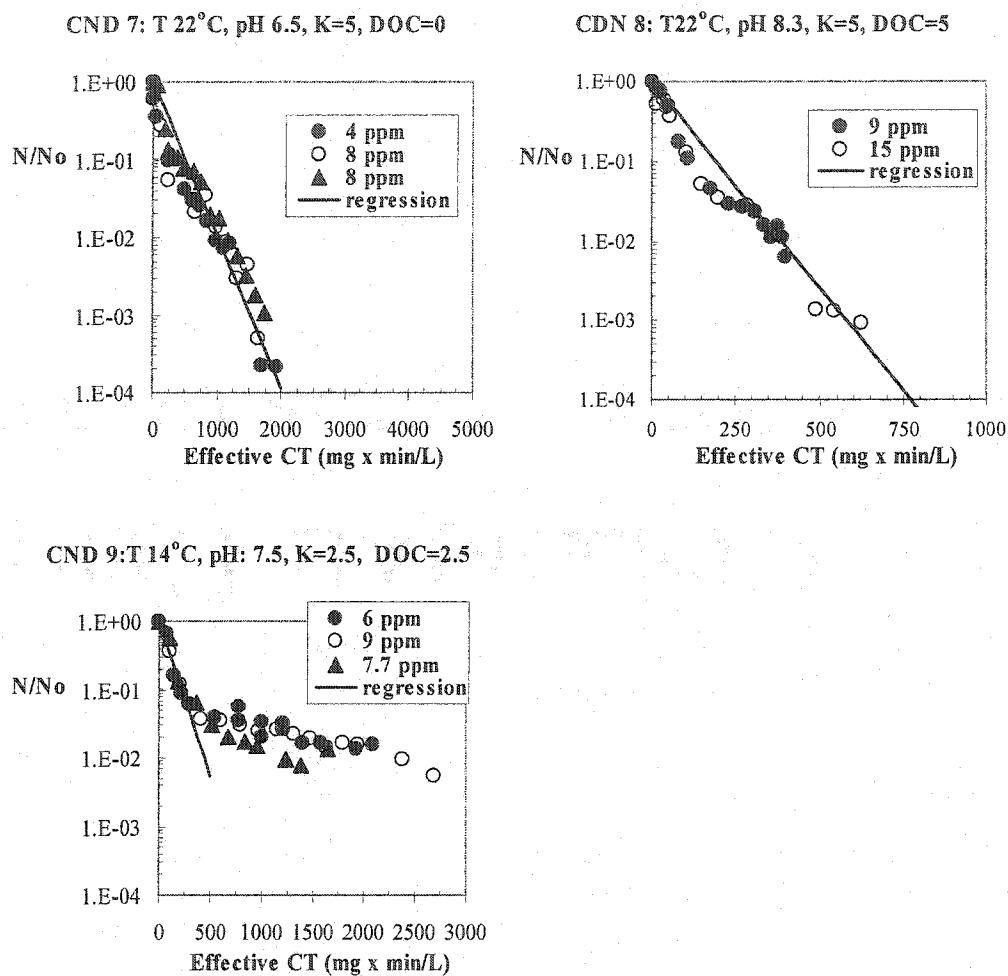


Figure B-2: Inactivation des spores de *B. subtilis* par le bioxyde de chlore pour différents types d'eau. Voir Tableau 3-2 pour la description des eaux.

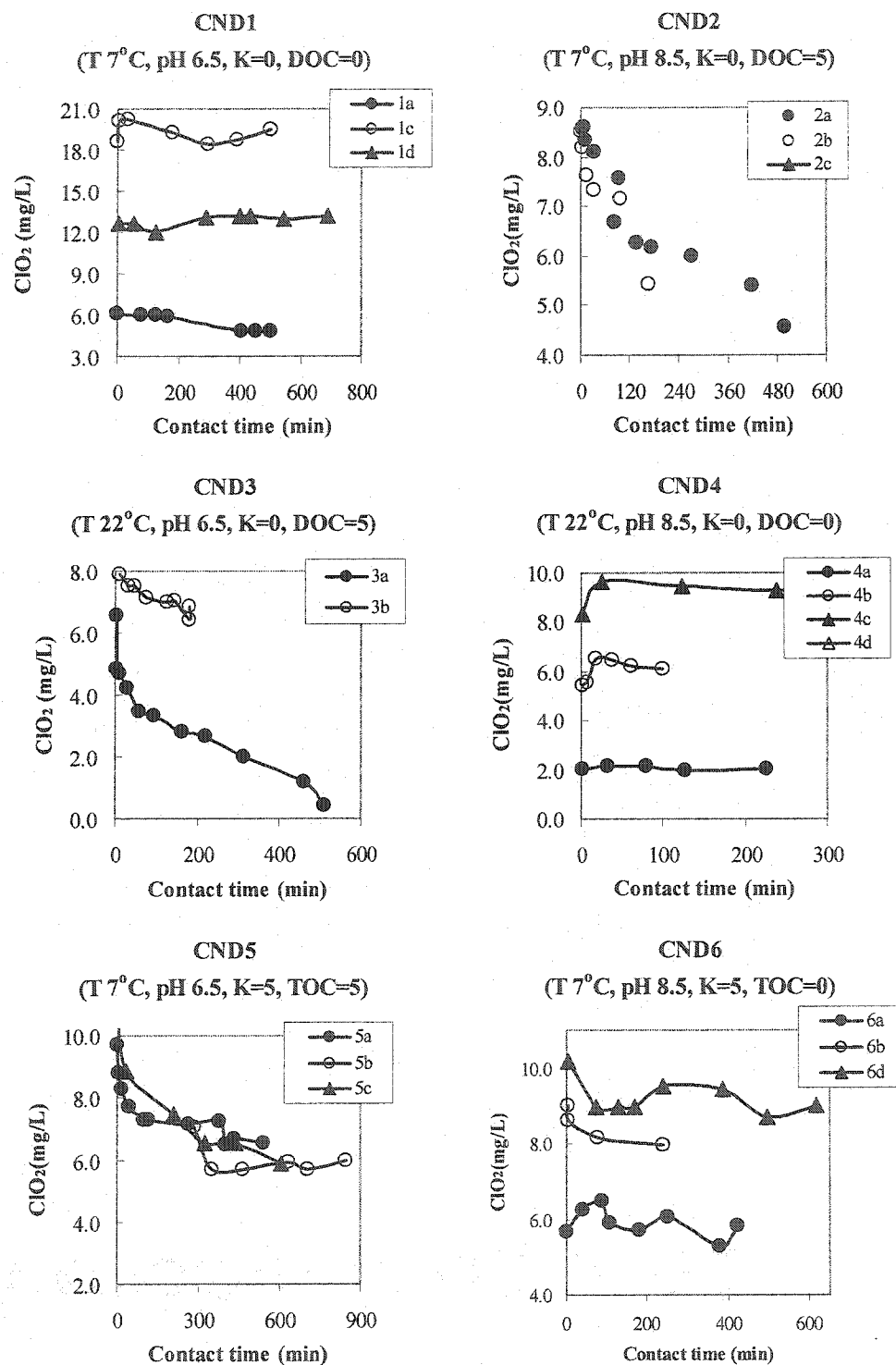


Figure B-3: Courbes de décroissance du chlore libre durant les essais (Conditions 1 à 6)

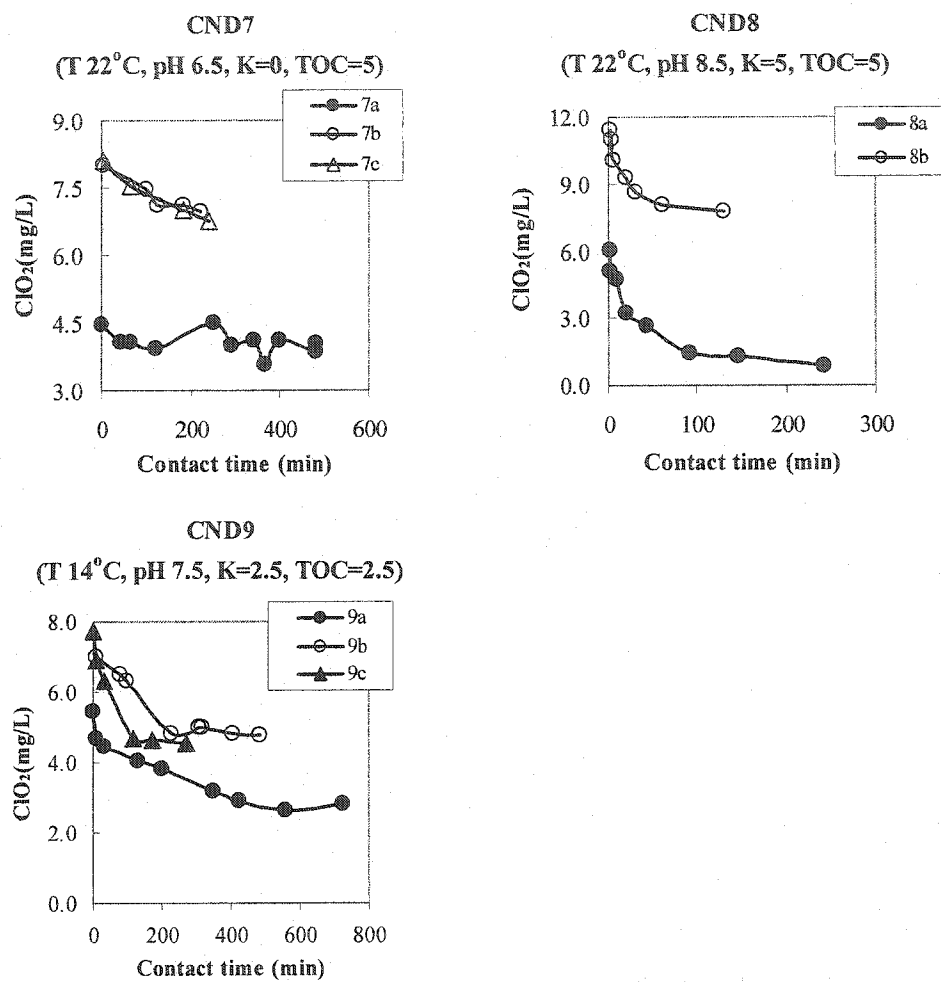


Figure B-4: Courbes de décroissance du chlore libre durant les essais (Conditions 7 à 9)

ANNEXE C

COURBES D'INACTIVATION DES COLIPHAGES MS2 PAR LA CHLORATION EN EAUX SYNTHÉTIQUES

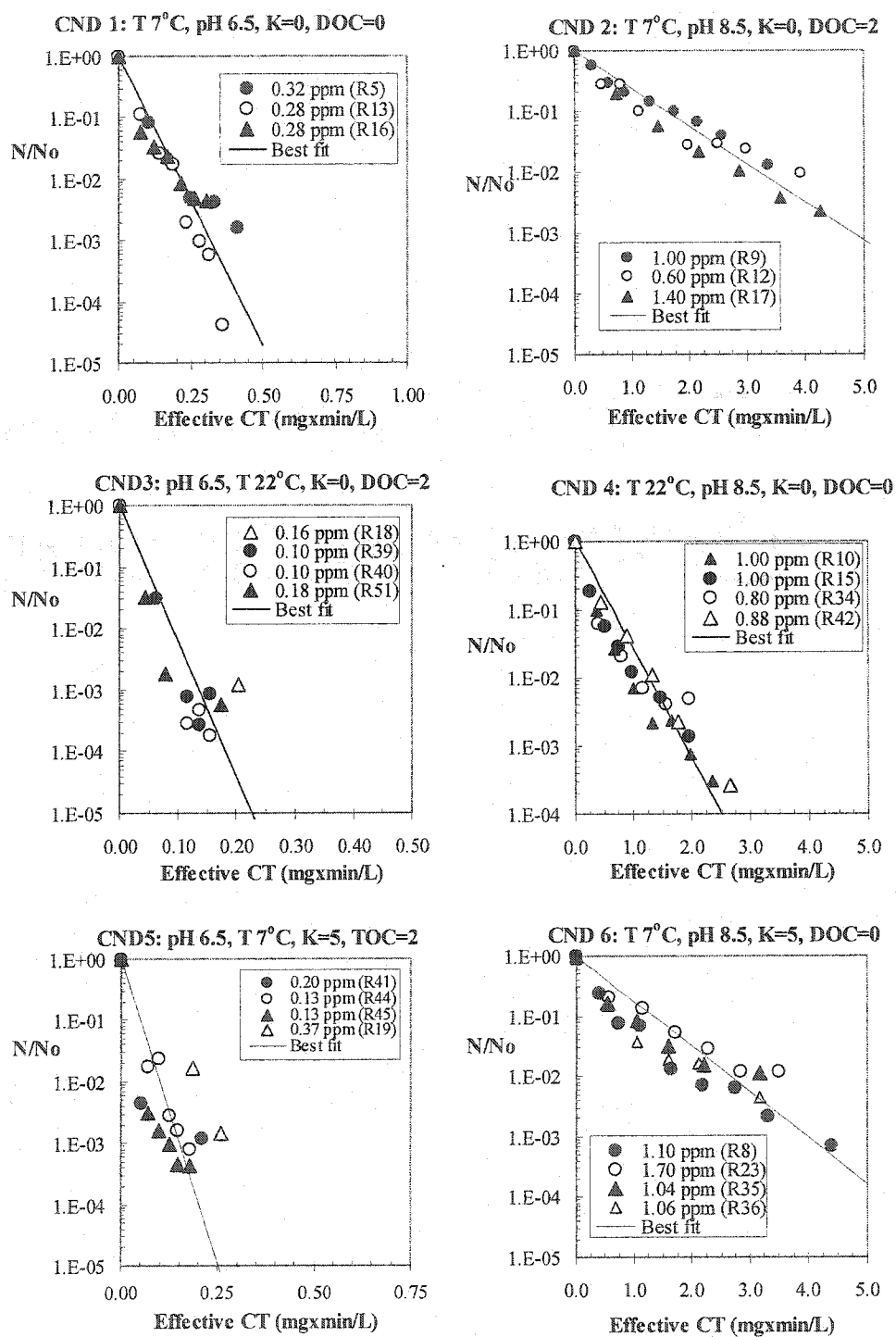


Figure C-1: Inactivation des coliphages par le chlore pour différents types d'eau.

Voir Tableau 3-2 pour la description des eaux.

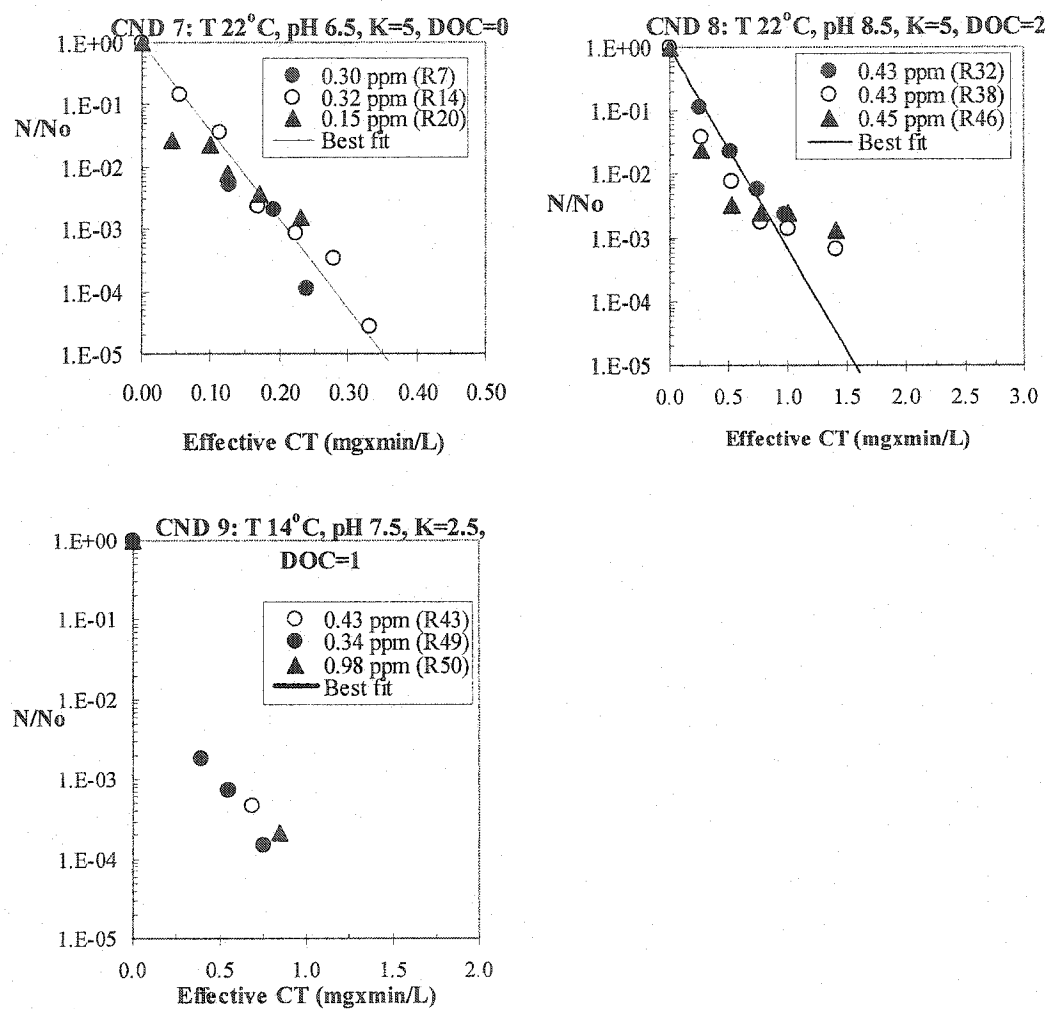
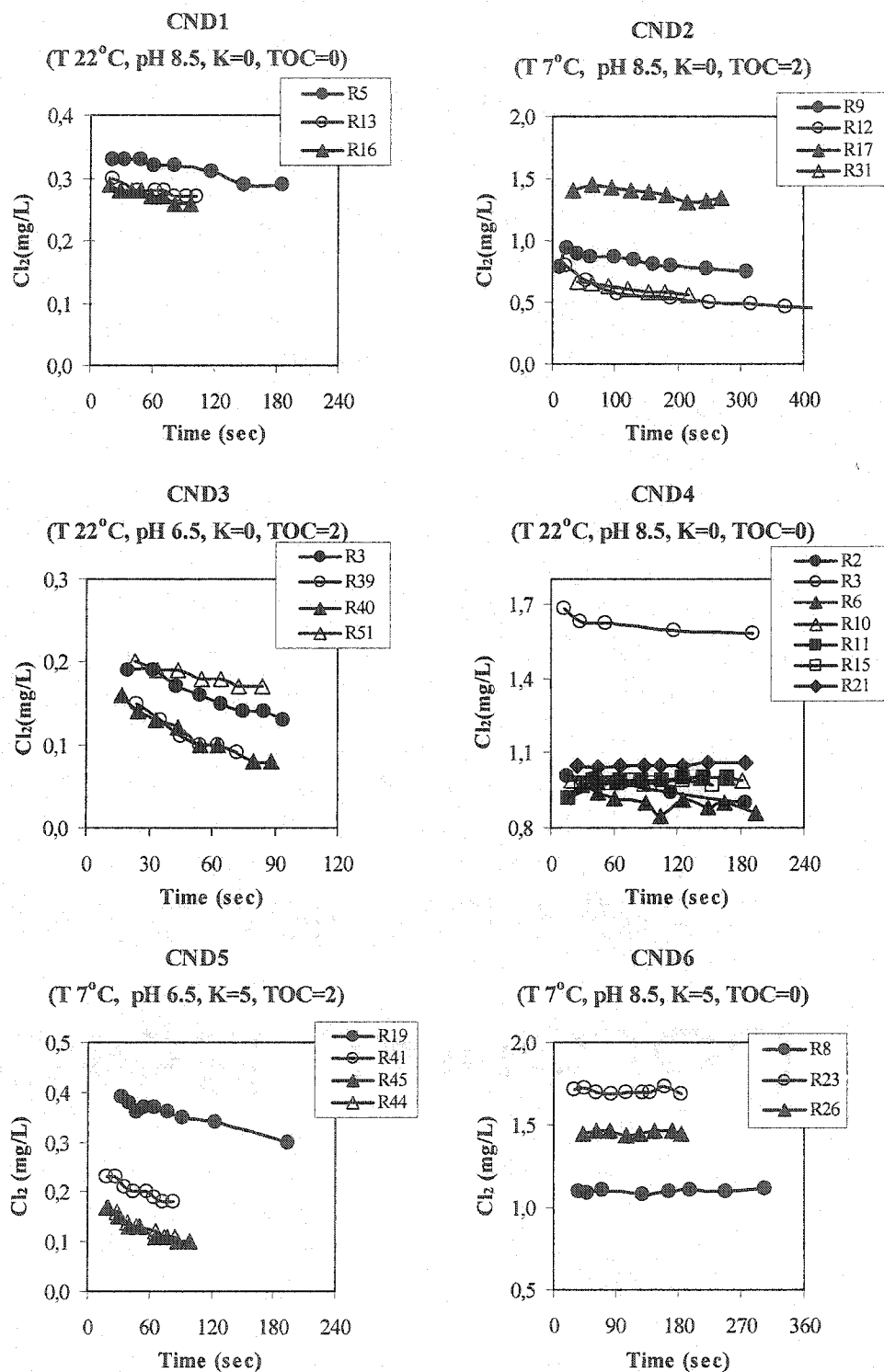
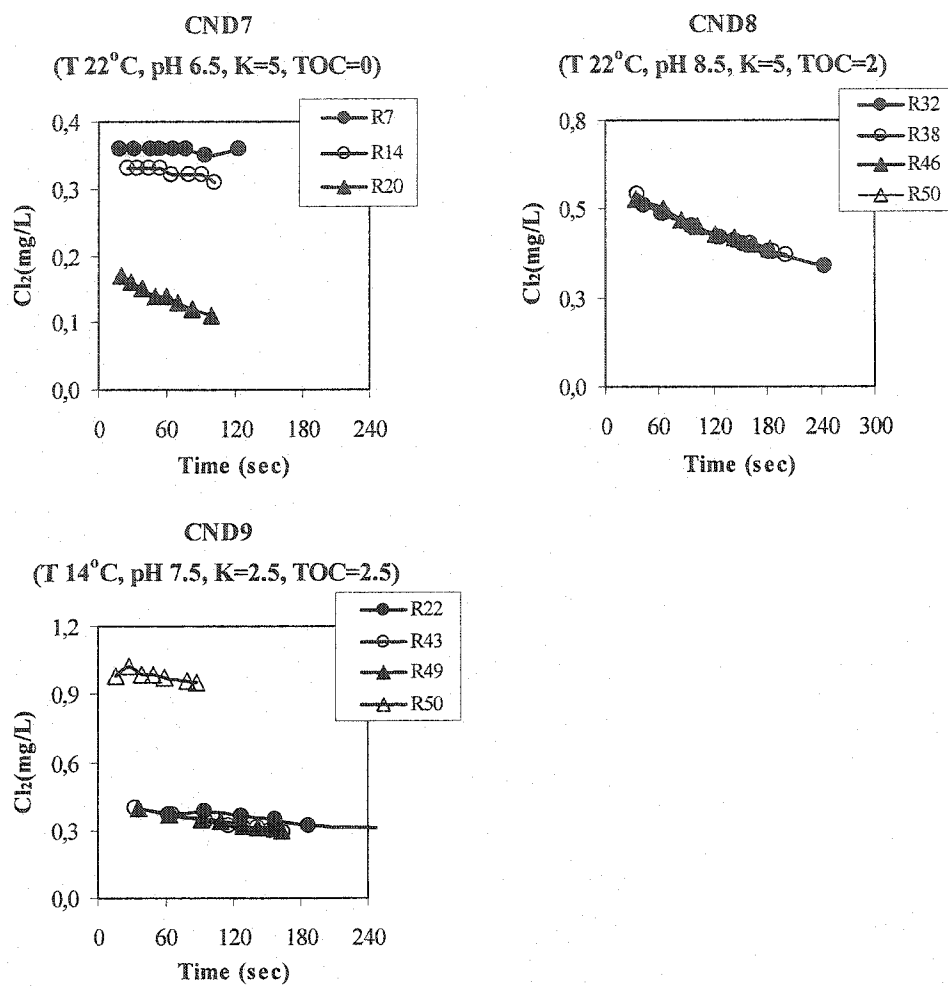


Figure C-2: Inactivation des coliphages par le chlore pour différents types d'eau.
Voir Tableau 3-2 pour la description des eaux.



**Figure C-3: Courbes de décroissance du bioxyde de chlore durant les essais
(Conditions 1 à 6)**



**Figure C-4: Courbes de décroissance du bioxyde de chlore durant les essais
(Conditions 7 à 9)**

ANNEXE D**COURBES D'INACTIVATION DES COLIPHAGES MS2
PAR LE BIOXYDE DE CHLORE EN EAUX
SYNTHÉTIQUES**

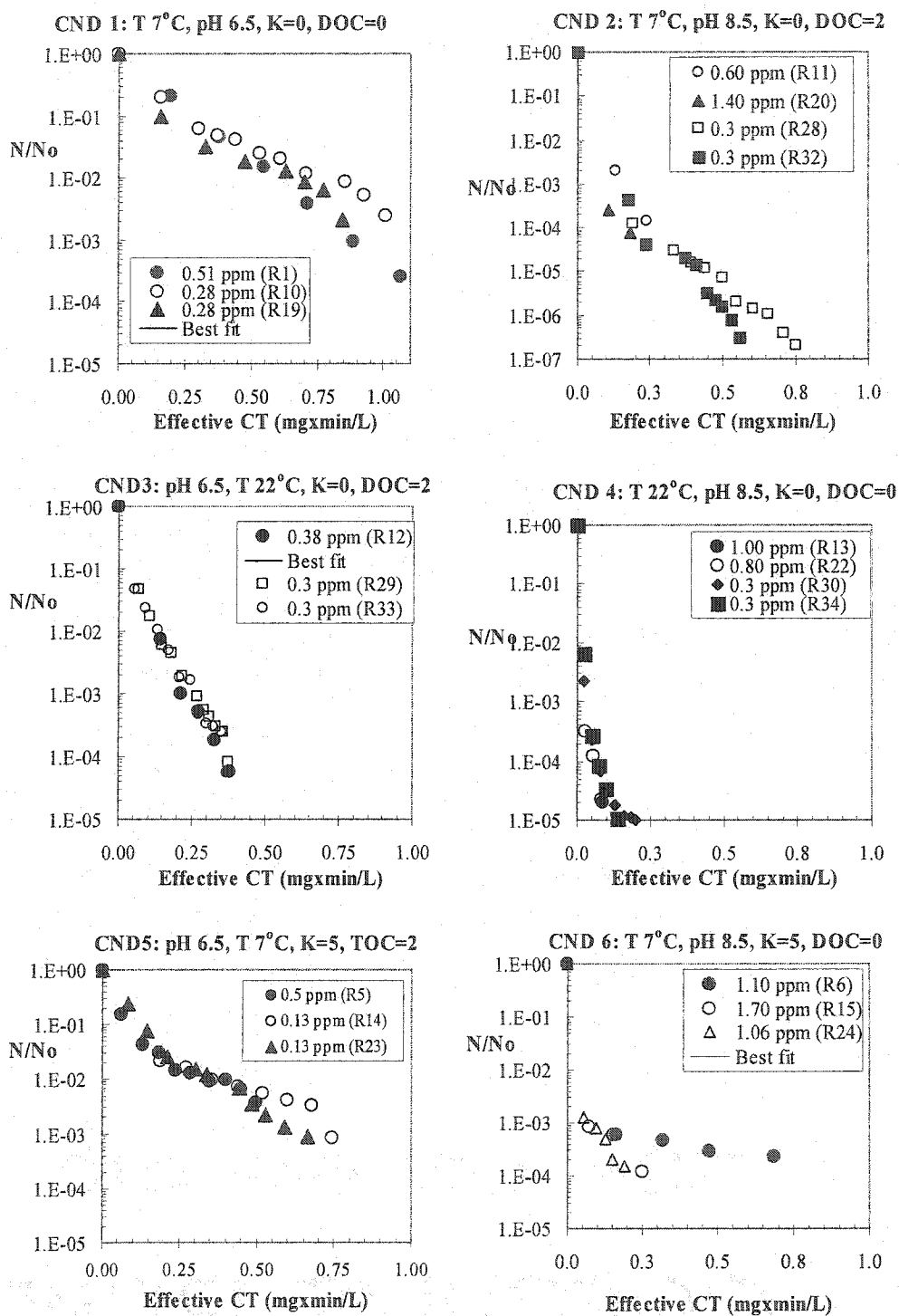


Figure D-1: Inactivation des coliphages MS2 par le bioxyde de chlore pour différents types d'eau. Voir Tableau 3-2 pour la description des eaux.

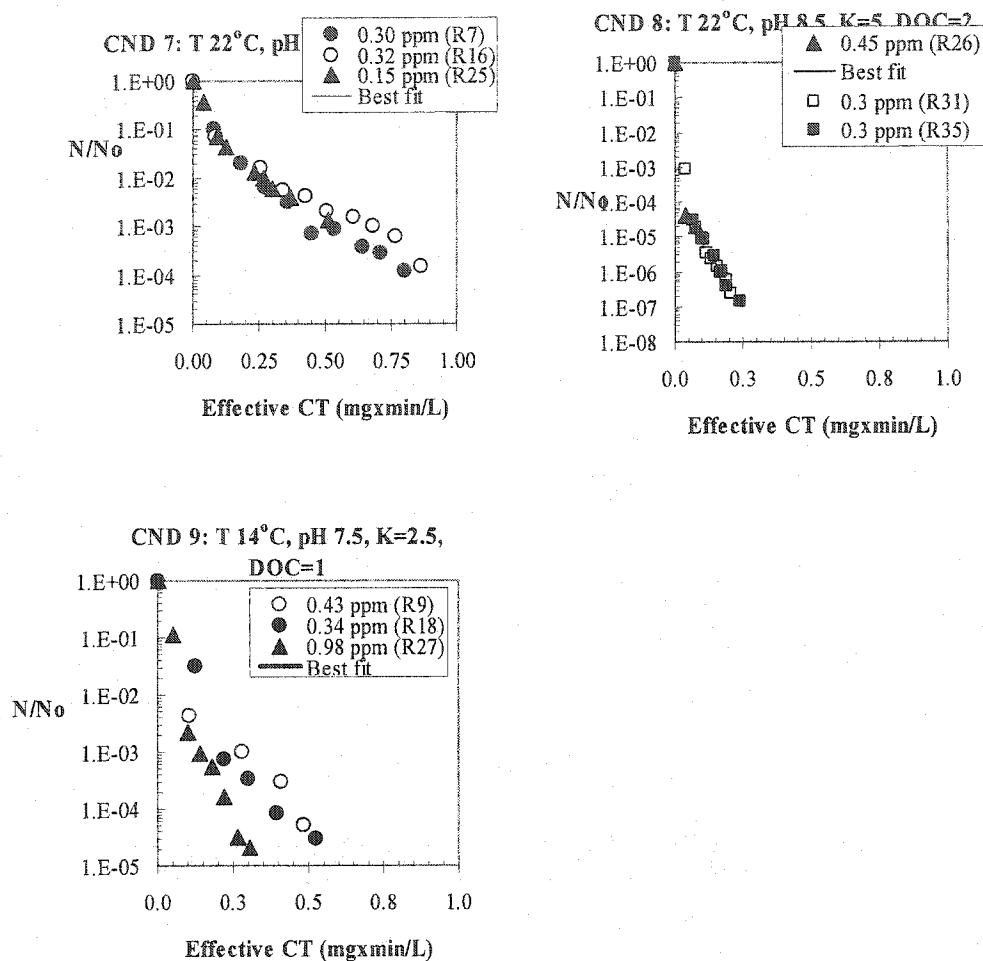
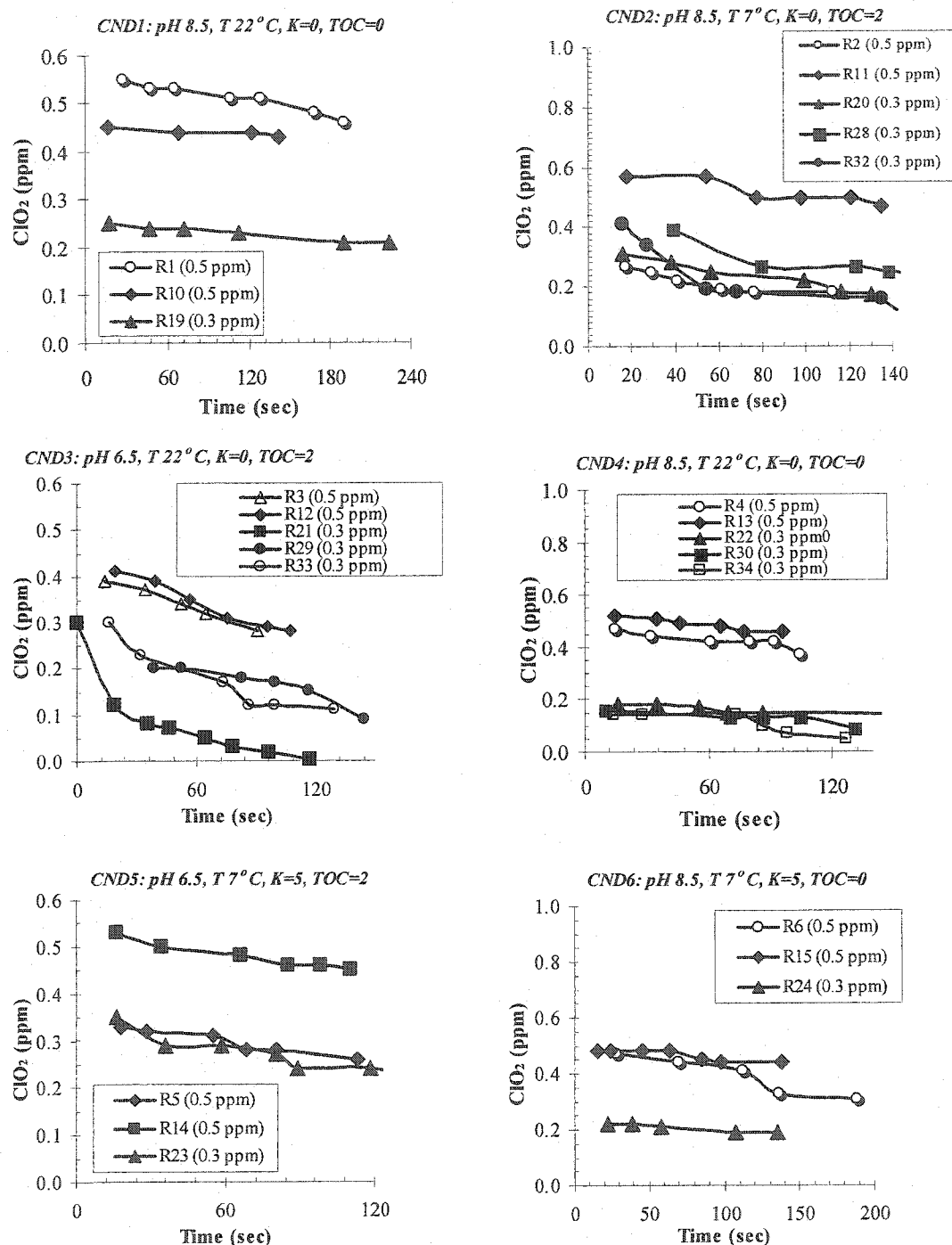


Figure D-2: Inactivation des coliphages MS2 par le bioxyde de chlore pour différents types d'eau. Voir Tableau 3-2 pour la description des eaux.



**Figure D-3: Courbes de décroissance du bioxyde de chlore durant les essais
(Conditions 1 à 6)**

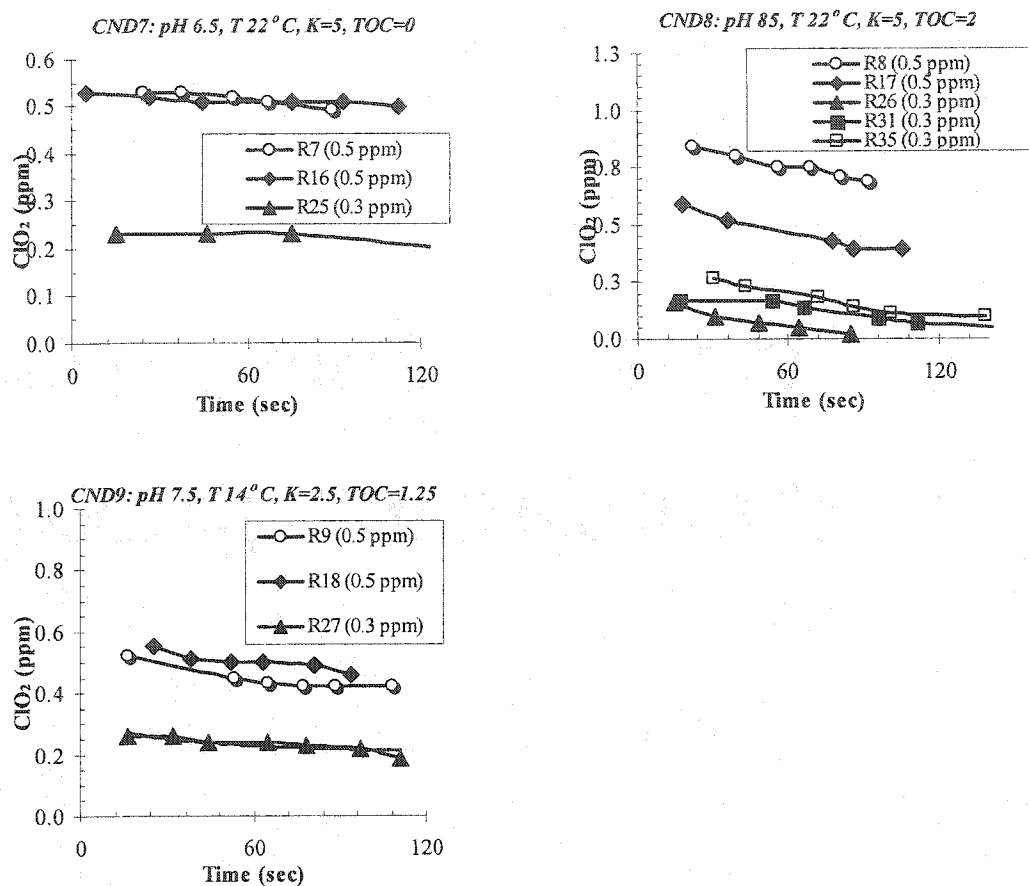


Figure D-4: Courbes de décroissance du bioxyde de chlore durant les essais (Conditions 7 à 9)

ANNEXE E

**DÉCROISSANCE DU CHLORE LIBRE ET DU BIOXYDE DE CHLORE
DURANT LES ESSAIS D'INACTIVATION EN EAUX NATURELLES**

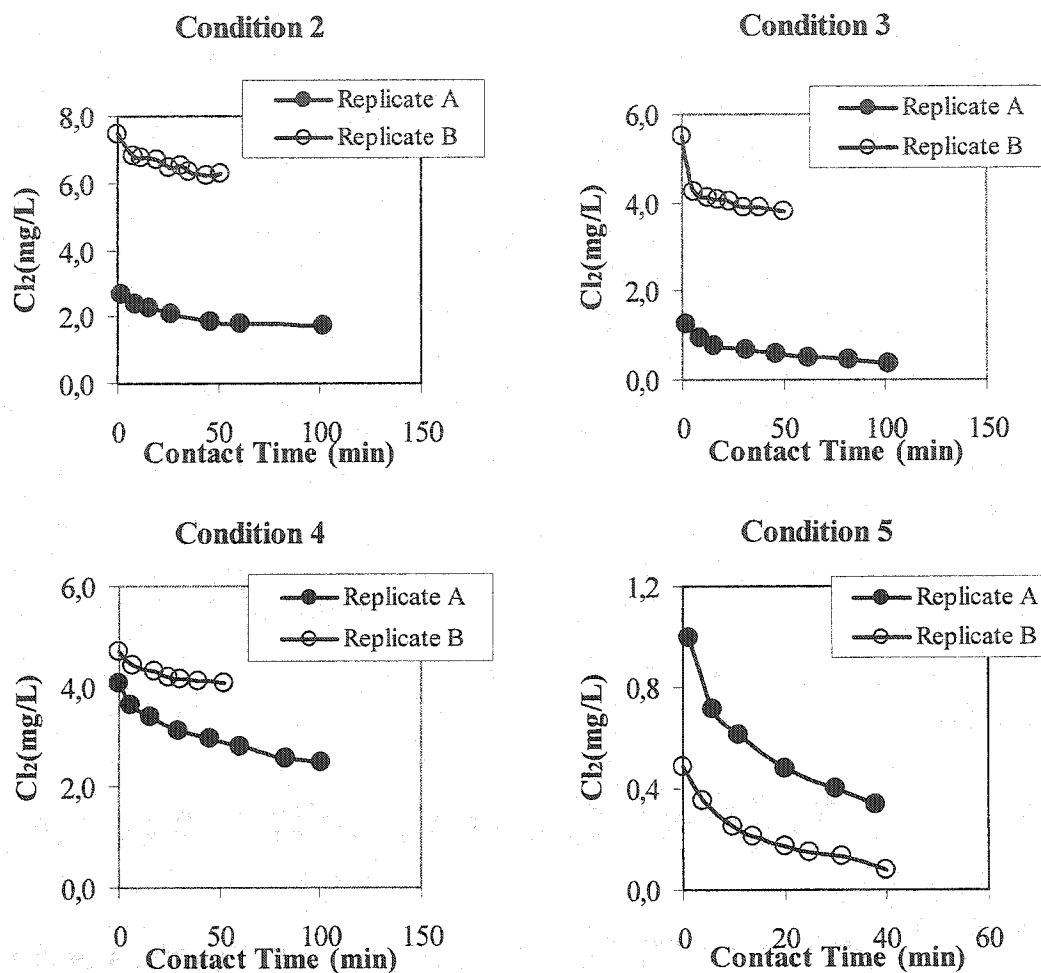


Figure E-1: Décroissance du chlore libre durant les essais d'inactivation dans les eaux de la Ville de Montréal. Voir tableau 3-5 pour une description des conditions des essais.

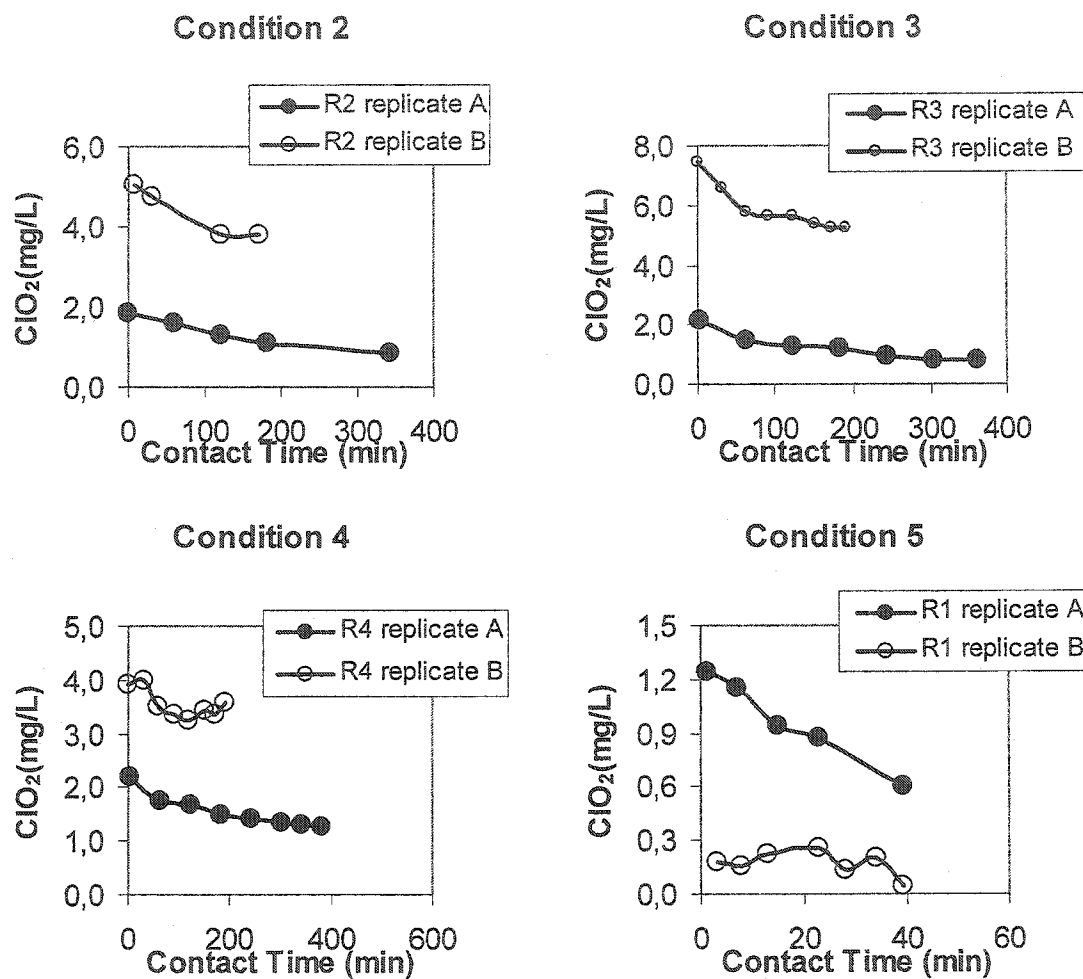


Figure E-2: Décroissance du bioxyde de chlore durant les essais d'inactivation dans les eaux de la Ville de Montréal. Voir tableau 3-5 pour une description des conditions des essais.

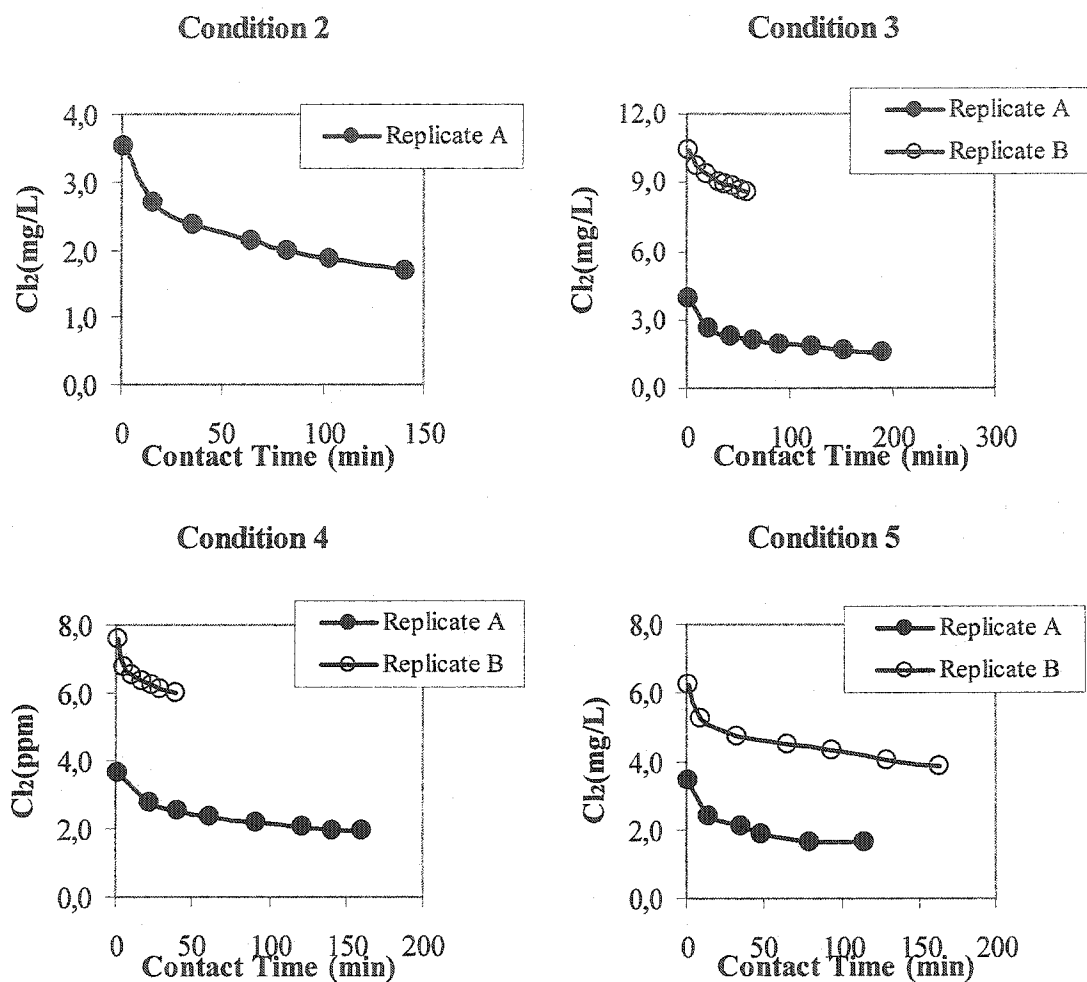


Figure E-3: Décroissance du chlore libre durant les essais d'inactivation dans les eaux de San Juan, Puerto-Rico. Voir tableau 3-6 pour une description des conditions des essais.

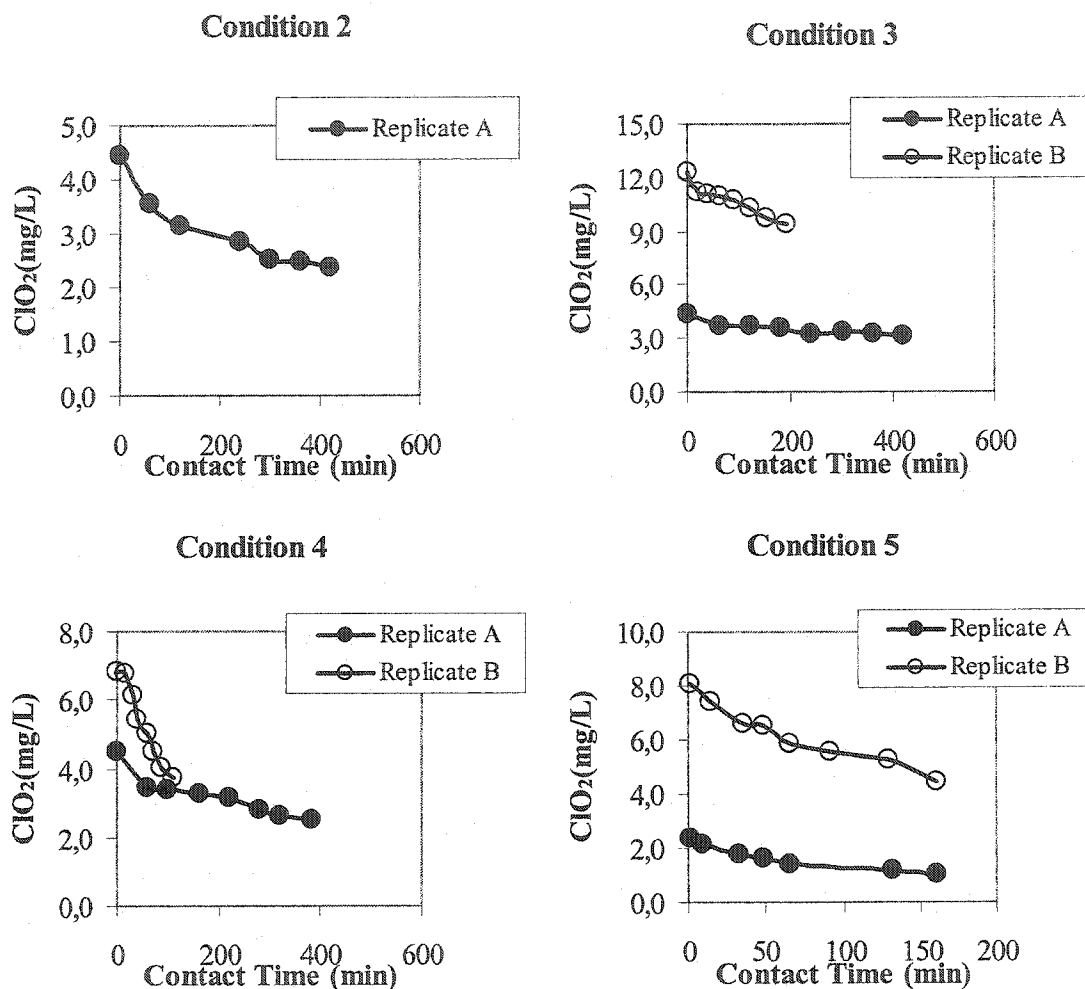


Figure E-4: Décroissance du bioxyde de chlore durant les essais d'inactivation dans les eaux de San Juan, Puerto-Rico. Voir tableau 3-6 pour une description des conditions des essais.

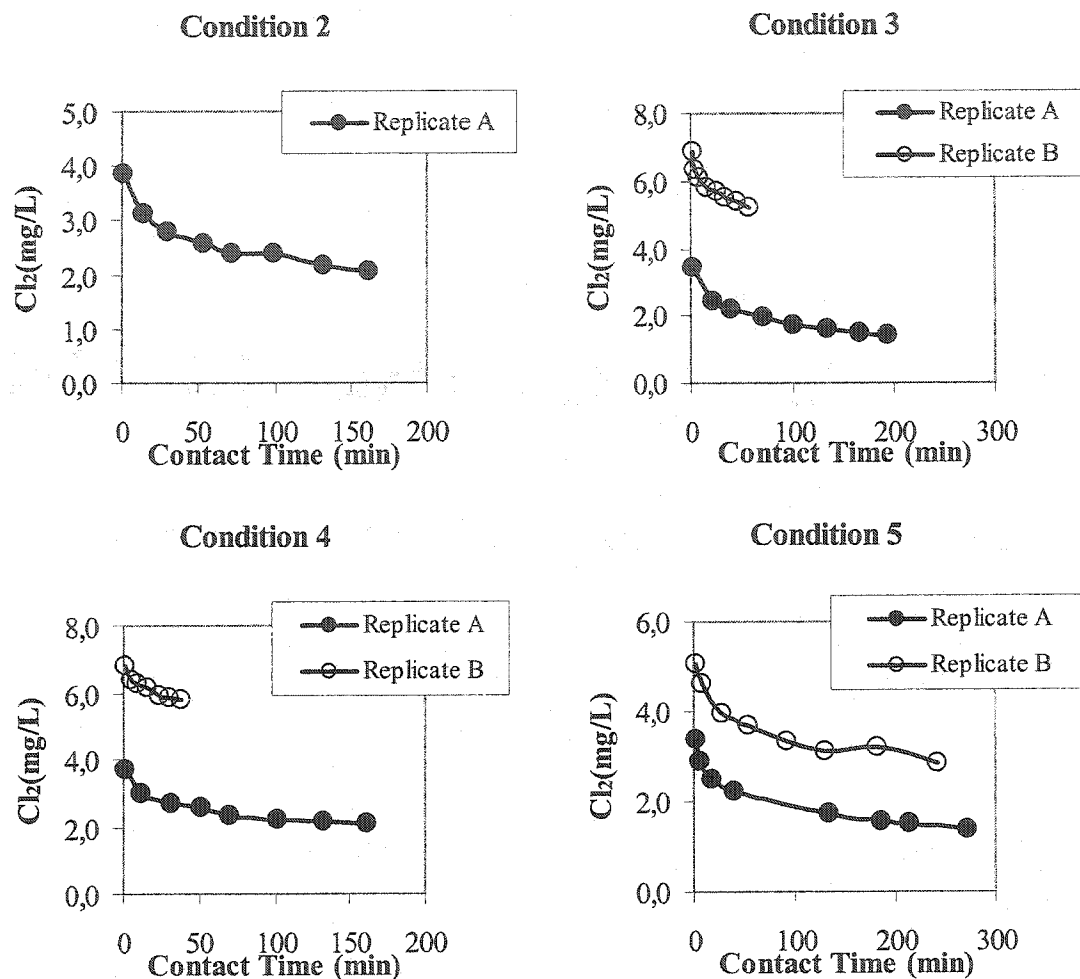


Figure E-5: Décroissance du chlore libre durant les essais d'inactivation dans les eaux de Gwinnett County, Georgia. Voir tableau 3-6 pour une description des conditions des essais.

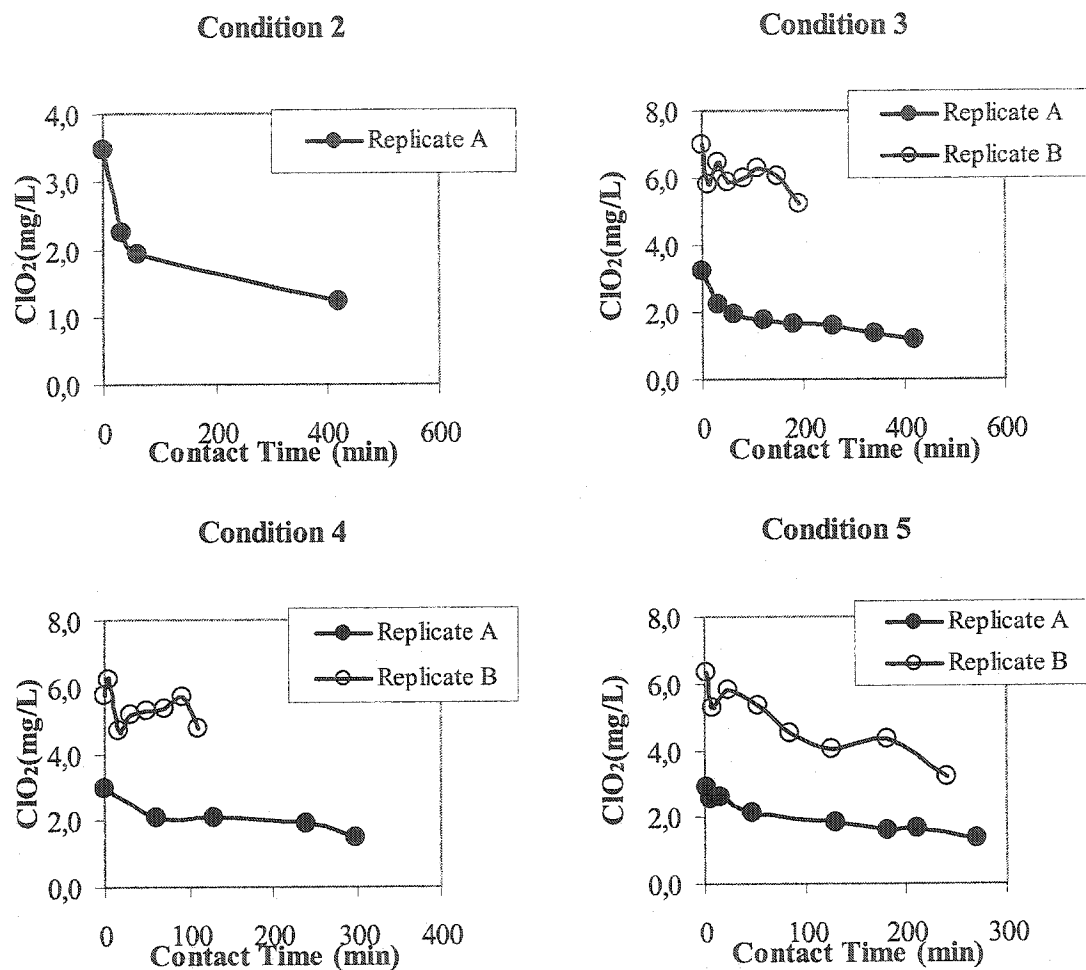


Figure E-6: Décroissance du bioxyde de chlore durant les essais d'inactivation dans les eaux de Gwinnett County, Georgia. Voir tableau 3-6 pour une description des conditions des essais.

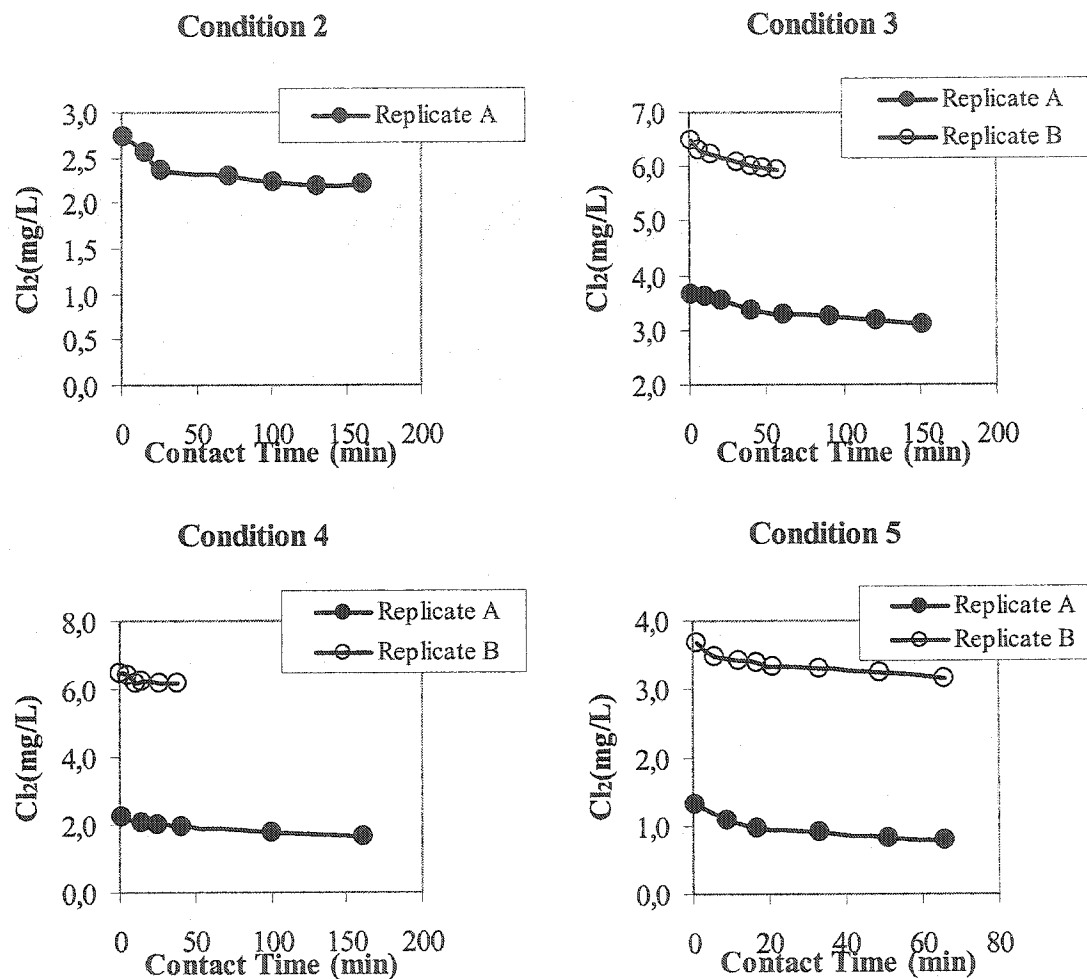


Figure E-7: Décroissance du chlore libre durant les essais d'inactivation dans les eaux de Grand Rapids, Michigan. Voir tableau 3-5 pour une description des conditions des essais.

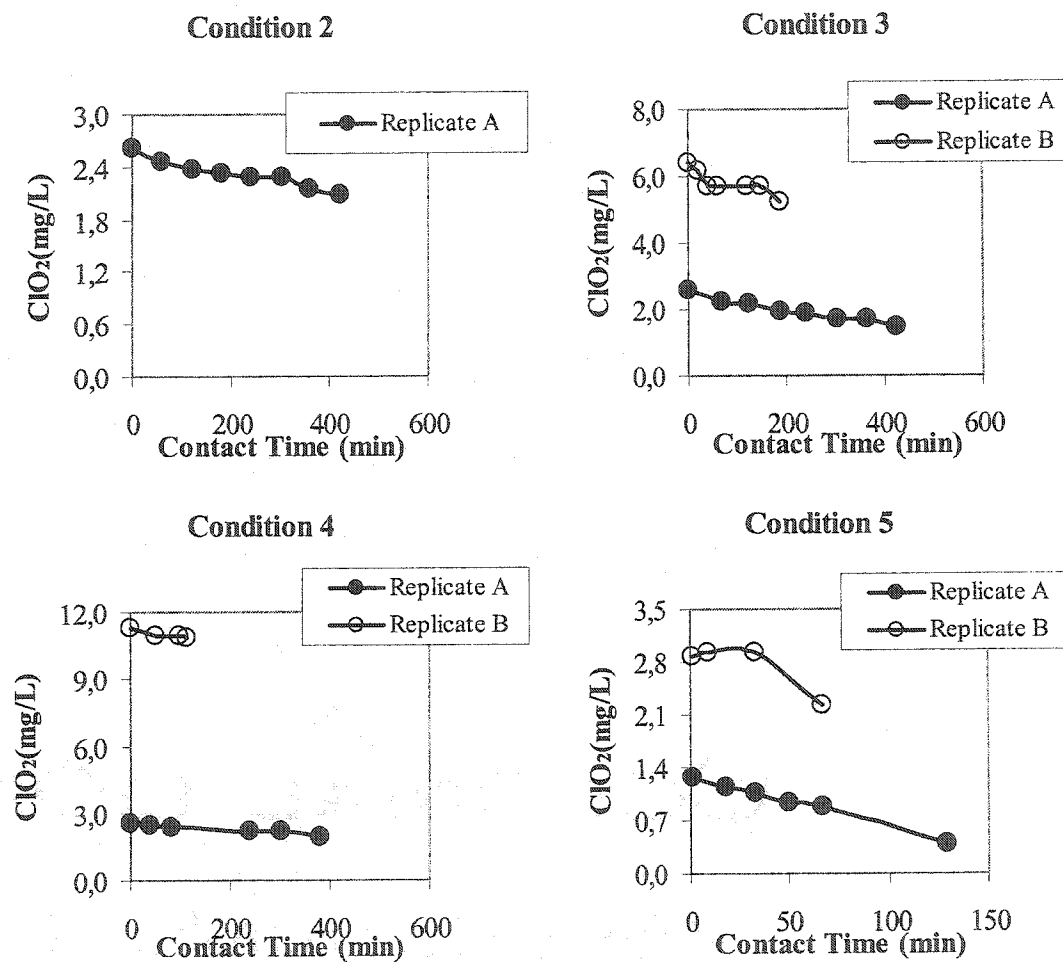


Figure E-8: Décroissance du chlore libre durant les essais d'inactivation dans les eaux de Grand Rapids, Michigan. Voir tableau 3-5 pour une description des conditions des essais.